

ANALYSE DER AKTIVIERUNG DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS
DURCH *CANDIDA* SPP. MITTELS LEBENDZELLMIKROSKOPIE

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller Universität Jena**

von Fabian Essig

geboren am 10.04.1990 in Bad Oldesloe

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Oliver Kurzai, Jena
2. Prof. Dr. med. Eberhard Straube, Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Sven Krappmann, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.12.2016

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
γ	gamma
bzw.	beziehungsweise
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ALS	<i>agglutinin-like sequence</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSI	Blutstrominfektion
BFP	Blau fluoreszierendes Protein
Ca^{2+}	Calcium-Ion
<i>C. a.</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. g.</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CO_2	Kohlendioxid
CR3	<i>complement receptor 3</i>
<i>D</i>	Diffusionskonstante
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH-DA	Dichlorofluoresceindiacetat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EPA-Gene	Epitheliale Adhäsions-Gene
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable region</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRO α	<i>growth-related oncogene α</i>

hiHS	Hitze-inaktiviertes humanes Serum
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOCl	hypochlorige Säure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LF	Laktoferrin
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MIF	<i>macrophage migration inhibition factor</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPO	Myeloperoxidase
MSD	<i>mean square displacement</i>
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NOD	<i>nucleotid-binding oligomerization domain</i>
NO ₂ Cl	Nitrylchloride
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>nucleotid-binding oligomerization domain-like receptor</i>
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxidion
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PMN	polymorphnucleäre Zellen
PI	Propidiumiodid
p. i.	<i>post infection</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
spp.	Spezies
SAPs	sekretorische Aspartylproteasen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Streptococcus cerevisiae</i>

SOD	Superoxiddismutase
TM	Trockenmasse
TLRs	Toll-like Rezeptoren
wt	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract-peptone-dextrose</i>
z. B.	zum Beispiel

Einheiten

%	Prozent
°C	Temperatur (Grad Celcius)
g	Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
h	Stunde
M	Stoffmengenkonzentration (Molar)
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
rpm	Drehzahl (Umdrehungen pro Minute)
t_p	<i>persistence time</i>
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	- 1 -
2	Einleitung	- 3 -
2.1	Invasive Mykosen durch <i>Candida</i>	- 3 -
2.2	<i>Candida albicans</i>	- 4 -
2.3	<i>Candida glabrata</i>	- 5 -
2.4	Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei invasiven <i>Candida</i> Infektionen.....	- 7 -
2.4.1	Interaktion von Immunzellen mit <i>Candida</i> spp.	- 8 -
2.4.2	Neutrophile Granulozyten	- 10 -
2.4.2.1	Effektormechanismen der PMN.....	- 10 -
2.5	Lebendzellmikroskopie	- 13 -
3	Ziele der Arbeit.....	- 15 -
4	Methoden	- 16 -
4.1	Gewinnung von Blutproben	- 16 -
4.2	Isolierung von neutrophilen Granulozyten	- 16 -
4.3	Überprüfung der Reinheit und Voraktivierung der isolierten PMN	- 17 -
4.4	Kultivierung von <i>Candida</i>	- 18 -
4.5	Primäre Konfrontationsexperimente	- 19 -
4.6	Analyse von PMN-Oberflächenmarker mithilfe der Durchflusszytometrie	- 19 -
4.7	Oxidativer Burst Assay	- 21 -
4.8	Quantifizierung von sezernierten Proteinen.....	- 22 -
4.9	Lebendzellmikroskopie	- 22 -
4.10	Analyse der Lebendzellmikroskopie	- 24 -
4.11	Software	- 27 -
4.12	Statistische Analyse	- 27 -
5	Ergebnisse	- 28 -

5.1	<i>C. albicans</i> und <i>C. glabrata</i> induzieren eine unterschiedliche Aktivierung der primären PMN	- 28 -
5.2	PMN töten <i>C. glabrata</i> effektiver als <i>C. albicans</i>	- 32 -
5.3	Unterschiedliche Zytokin-Sekretion der PMN nach Konfrontation mit beiden <i>Candida</i> spp.	- 35 -
5.4	PMN phagozytieren <i>C. albicans</i> häufiger als <i>C. glabrata</i>	- 37 -
5.5	Koinkubation von PMN mit beiden <i>Candida</i> spp. resultiert in keiner veränderten Aufnahme von <i>C. glabrata</i>	- 40 -
5.6	<i>C. glabrata</i> werden häufiger kontaktiert, aber weniger phagozytiert.....	- 41 -
5.7	<i>C. albicans</i> induziert eine stärkere Motilität in PMN als <i>C. glabrata</i>	- 43 -
6	Diskussion.....	- 45 -
6.1	Lebendzellmikroskopie zur Visualisierung der Immunzellinteraktion	- 46 -
6.2	<i>Candida</i> spp. werden von PMN unterschiedlich effektiv phagozytiert	- 47 -
6.3	<i>Candida</i> spp. induzieren unterschiedliche migratorische Aktivität in PMN- -	49
6.4	PMN Aktivierung durch <i>C. albicans</i> und <i>C. glabrata</i>	- 50 -
7	Schlussfolgerungen	- 55 -
8	Literaturverzeichnis	- 56 -
9	Anhang.....	- 65 -
9.1	Verzeichnis zu den angefügten lebendzellmikroskopischen Videos.....	- 65 -
9.2	Vorträge und Publikationen	- 67 -
9.3	Danksagung	- 68 -
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	- 70 -

1 Zusammenfassung

In der Gattung *Candida* sind *C. albicans* und *C. glabrata* die beiden häufigsten Erreger von invasiven Infektionen. Obwohl die beiden Spezies derselben Gattung angehören, unterscheiden sich ihre Virulenzmechanismen wesentlich. Die Fähigkeit von *C. albicans* zwischen einer einzelligen Hefeform und einer filamentösen Wachstumsform zu wechseln, vermittelt Gewebeinvasivität und induziert die Aktivierung von Immunzellen. *C. glabrata* dahingegen kann *in vivo* keine Filamente ausbilden. Da *C. albicans* und *C. glabrata* sowohl als Kommensale als auch als Erreger lebensbedrohlicher Infektionen vorkommen können und die Entwicklung einer Sepsis mit einer Dysfunktion des Immunsystems einhergeht, ist gerade die Kenntnis über die Pathogen-Wirt-Interaktion von zentraler Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie zeitaufgelöste Aufnahmen zu generieren, die eine detaillierte Untersuchung der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (PMN) durch die beiden *Candida* spp. erlaubt. Des Weiteren sollten die lebendzellmikroskopischen Aufnahmen genutzt werden, um Algorithmen für eine automatisierte Bilderanalyse zu entwickeln.

Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass *C. albicans* eine signifikant stärkere PMN-Aktivierung induziert als *C. glabrata*, was in einer erhöhten Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Sekretion antimikrobieller Peptide resultiert. Dennoch genügte die moderate Aktivierung der PMN, um phagozytierte *C. glabrata* effektiver abzutöten als *C. albicans*. Lebendzellmikroskopisch konnte belegt werden, dass *C. albicans* signifikant häufiger phagozytiert wurde als *C. glabrata*. Dies war nicht auf den fehlenden Kontakt zwischen den Immunzellen und *C. glabrata* zurückzuführen, sondern auf eine geringere Phagozytose-Effektivität der PMN nach Kontakt mit dem Pilz. Neben der gesteigerten Phagozytose-Rate induzierte *C. albicans* auch eine höhere Motilität der PMN als *C. glabrata*. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die stärkere Ausschüttung von IL-8 und GRO α während der Konfrontation der PMN mit *C. albicans* sein. Beide Chemokine sind starke PMN Chemoattraktoren und wirken als PMN-aktivierende Faktoren. Im Gegensatz dazu induzierte die Koinkubation von PMN mit *C. glabrata* eine signifikant stärkere Produktion von MIP-1 α und MIP-1 β und keine Freisetzung von MIF. Dies wiederum deutet auf eine mögliche Involvierung von Monozyten in der Abwehr von *C. glabrata* Infektionen hin.

Zusammenfassend hat diese Arbeit durch die Etablierung der Lebendzellmikroskopie zu einem besseren Verständnis der Interaktion zwischen PMN und den beiden *Candida* spp. beigetragen. Zum ersten Mal konnten signifikante Unterschiede in der Immunantwort von Neutrophilen auf *C. albicans* und *C. glabrata* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde durch die Entwicklung einer vollautomatisierten PMN Trackingmethode ein wichtiger Grundstein für die zukünftige Etablierung einer vollautomatisierten Bilderanalyse der Pathogen-Wirt-Interaktion gelegt.

2 Einleitung

2.1 Invasive Mykosen durch *Candida*

Die klinische Relevanz von Pilzinfektionen hat weltweit zugenommen. In Deutschland werden zwischen 7-15% aller nosokomialen Infektionen durch Pilze verursacht (Ostrosky-Zeichner und Pappas 2006). Besonders bei immunkomprimierten und schwerstkranken Patienten der Intensivstationen stellen invasive Pilzinfektionen eine schwerwiegende Komplikation dar. *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* und seltener Fadenpilze wie Zygomyceten und Fusarien können lebensbedrohliche systemische Infektionen verursachen. Die Gattung *Candida* beinhaltet die häufigsten Erreger von invasiven Pilzinfektionen und ist der vierthäufigste Erreger als Auslöser von Blutstrominfektionen (BSI) (Wisplinghoff et al. 2004, Fridkin und Jarvis 1996, Pfaller und Diekema 2007). Die invasive Candidiasis ist mit einer sehr hohen Mortalität assoziiert. Verschiedene Studien beziffern die Sterblichkeit zwischen 30-60% (Wisplinghoff et al. 2004, Pfaller et al. 2012). Ausgehend von einer Besiedlung des Darms oder des Mundraums dienen Defekte der Haut- oder Schleimhaut als Eintrittspforte und Zugang in den systemischen Blutkreislauf (Koh et al. 2008). Diese Infektion der Blutbahn (Candidämie) ist die häufigste Manifestation der invasiven Candidiasis. Über die Blutbahn disseminiert *Candida* in die inneren Organe (disseminierte Candidiasis). Hier können unter anderem die Leber, Milz oder auch das Auge betroffen sein. Das höchste Infektionsrisiko besteht bei Patienten mit Neutropenie und Patienten unter immunsupprimierender Therapie. Intensivmedizinische Maßnahmen erhöhen ebenfalls das Risiko für systemische Pilzinfektionen: In verschiedenen Studien wurden die langfristige Gabe von Breitbandantibiotika, die Anlage zentraler oder intravaskulärer Venenverweilkanülen, parenterale Ernährung und die mechanische Beatmung als unabhängige Risikofaktoren identifiziert. Erkrankungen wie Verbrennungen, Verletzungen oder Operationen im Bauchraum, HIV, Krebs (Leukämie) und Diabetes sind weitere Risikofaktoren (Yapar 2014).

Innerhalb der Gattung *Candida* sind *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* und *C. krusei* für 95% der Infektionen verantwortlich. Der am häufigsten isolierte Erreger ist *C. albicans* (Pfaller und Diekema 2007, Pfaller et al. 2012, Wisplinghoff et al. 2004). Allerdings können zunehmend häufiger sogenannte nicht-

C. albicans Stämme nachgewiesen werden, wobei *C. glabrata* nach *C. albicans* der zweithäufigste Vertreter ist (Pfaller et al. 2014). Dies wird im Zusammenhang mit dem verbreitenden Einsatz von Antimykotika zur prophylaktischen oder empirischen Therapie gesehen, da Arten wie *C. glabrata* und *C. krusei* eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Azolantimykotika aufweisen (Nguyen et al. 1996).

2.2 *Candida albicans*

Hefepilze der Gattung *Candida* gehören zu der Klasse der Schlauchpilze (Ascomycota). Von über 150 verschiedenen Pilzen der Gattung *Candida* sind lediglich 20 für den Menschen von Bedeutung. Der am häufigsten vorkommende Erreger der *Candida* spp. , *C. albicans*, ist ein polymorph wachsender Pilz. *C. albicans* Hefen kommen ubiquitär als Kommensale der Mundschleimhaut, des Gastrointestinaltraktes oder der Vaginalschleimhaut vor und können bei mehr als 50% aller gesunden Menschen nachgewiesen werden (Ruhnke und Maschmeyer 2002). Als opportunistischer Krankheitserreger verursacht *C. albicans* sowohl superfizielle Mykosen, wie die orale oder vulvovaginale Candidose, als auch systemische, lebensbedrohliche Candidosen (Calderone und Fonzi 2001, Singh et al. 2014, Sobel 2007). Eine Reihe von Virulenzfaktoren tragen zur Pathogenität von *C. albicans* bei. Hierzu gehören unter anderem Proteine der ALS (*Agglutinin-like sequence*) -Familie. Diese vermitteln die Adhäsion zu anderen *C. albicans*, Mikroorganismen, abiotischen Oberflächen oder Wirtszellen (Liu und Filler 2011). ALS3 ist zudem für die Aufnahme von Eisen essentiell (Almeida et al. 2008). Sezernierte Aspartylproteasen (SAPs) und Phospholipasen tragen zur Invasivität bei. Hyphen-assoziiert werden SAP3-5 exprimiert, die Wirtszellen zerstören und dadurch Oligopeptide und Aminosäuren freisetzen, was auch der eigenen Ressourcenbeschaffung dient (Naglik et al. 2004).

Einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor stellt der Polymorphismus von *C. albicans*, das heißt die Fähigkeit zwischen verschiedenen Wachstumsformen zu wechseln, dar. Hierbei wird zwischen der einzelligen Hefeform und filamentösen Wachstumsformen unterschieden. Bei einem $\text{pH} \leq 6$ und atmosphärischen CO_2 wächst *C. albicans* überwiegend in einzelnen ovalen Hefezellen, die Blastokonidien

genannt werden (Abb. 1A). Zur filamentösen Wachstumsphase werden Pseudohyphen und echte Hyphen gerechnet (Sudbery et al. 2004). Ein $\text{pH} \geq 7$, die Anwesenheit von Serum oder N-Acetylglucosamin, physiologische Temperaturen und höhere CO_2 -Level induzieren die Ausbildung von echten Hyphen (Abb. 1B). Beide Wachstumsformen tragen zur Virulenz von *C. albicans* bei. Sowohl die filamentöse Wachstumsform als auch die Hefeform können während des Infektionsprozesses gefunden werden (Jacobsen et al. 2012). Hierbei sollen *C. albicans* Hefen für die Disseminierung im Blut eine wichtige Rolle spielen (Saville et al. 2003). Die Ausbildung von Keimschläuchen kann zur Wirtszellschädigung führen und trägt damit sowohl zur Invasivität als auch zum Überleben innerhalb des menschlichen Organismus bei. Epithelzellen werden aktiv penetriert, wodurch *C. albicans* Zugang zum Blutstrom gewinnt und sich darüber im Organismus verteilen kann (Dalle et al. 2010). Ebenso stellt die Filamentbildung einen effektiven Mechanismus dar, mit welchem sich *C. albicans* nach Phagozytose aus Makrophagen befreien kann (Ghosh et al. 2009, Kurzai et al. 2005).

2.3 *Candida glabrata*

Einst noch als *Torulopsis glabrata* bezeichnet, wurde *C. glabrata* aufgrund der Pathogenität dem Genus *Candida* zugeordnet (Fidel et al. 1999). Bei ansteigender Prävalenz verursacht *C. glabrata* mittlerweile 46,4% der invasiven Candidiasis, die durch nicht-*C. albicans* Spezies bedingt sind (Pfaller et al. 2014). Wie *C. albicans* kommt *C. glabrata* sowohl als Kommensale bei asymptomatischen Patienten als auch als Erreger lebensbedrohlicher Infektionen vor. Daher gehört auch *C. glabrata* zu den opportunistischen Pathogenen. Phylogenetisch bestehen zwischen *C. glabrata* und *C. albicans* große Unterschiede, wohingegen *C. glabrata* und die apathogene Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nahe miteinander verwandt sind. Geringe genetische Modifikationen haben hierbei ausgereicht, um sich im Vergleich zu *S. cerevisiae*, zu einem Pathogen zu entwickeln (Dujon et al. 2004). *C. glabrata* wächst streng haploid als monomorphe Hefe (Sinnott et al. 1987) (Abb. 1C). Die Blastokonidien sind mit 1-4 μm kleiner als die 4-6 μm großen Blastokonidien von *C. albicans* (Fidel et al. 1999).

Während die Sekretion hydrolytischer Enzyme und das Ausbilden von Filamenten entscheidende Virulenzfaktoren von *C. albicans* sind, spielen sie bei *C. glabrata* keine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu anderen Spezies der Gattung *Candida* bildet *C. glabrata* keine Hyphen (Kaur et al. 2005). Auch Pseudohyphen werden nur unter wenigen Bedingungen wie z. B. Stickstoffmangel ausgebildet. Allerdings konnten in Isolaten aus Patientenmaterial bisher keine Pseudohyphen gefunden werden (Csank und Haynes 2000). Der Vergleich mit der nahe verwandten Art *S. cerevisiae* lässt einige Rückschlüsse darüber zu, welche Faktoren *C. glabrata* zu einem erfolgreichen Kommensale und Pathogen machen. Zu den bisher bekannten Virulenzfaktoren gehören neben einer erhöhten Stressresistenz und der Fähigkeit auch längere Mangelzustände zu überdauern, eine starke Adhärenz an verschiedene Oberflächen wie z. B. Katheter (Roetzer et al. 2011). Diese stellen eine wichtige Eintrittspforte für *C. glabrata* Infektionen dar. Des Weiteren führt die natürliche Resistenz gegenüber Azolen besonders in Ländern, in denen vorwiegend mit Fluconazol therapiert wird, zu einer zunehmenden Therapieresistenz (Pfaller und Diekema 2004, Hitchcock et al. 1993).

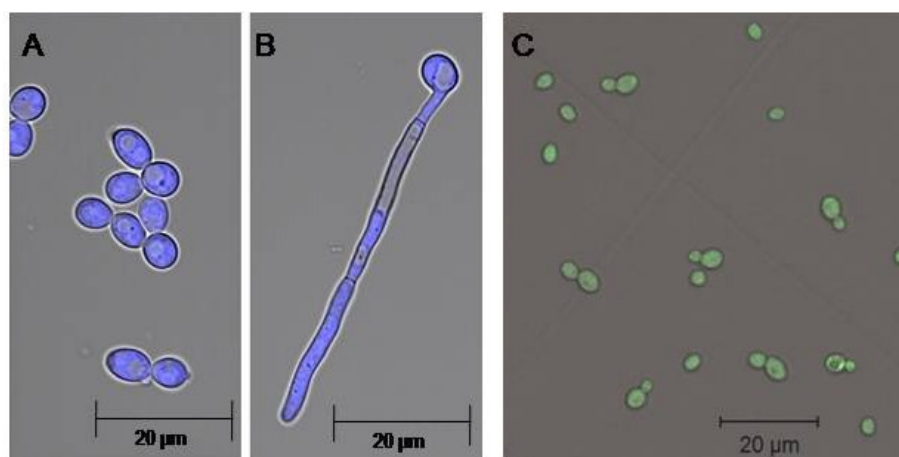


Abbildung 1: *Candida albicans* und *Candida glabrata*.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von BFP-exprimierenden *C. albicans* und GFP-exprimierenden *C. glabrata* Mutanten. *C. albicans* (A, B) kann zwischen der (A) Hefeform und der (B) filamentösen Wachstumsform wechseln, während *C. glabrata* (C) *in vivo* lediglich als Hefe vorkommt.

2.4 Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei invasiven *Candida* Infektionen

Das angeborene Immunsystem übernimmt wichtige Aufgaben in der primären Erregerabwehr von invasiven *Candida* Infektionen und stellt gleichzeitig eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar. Nach Überwinden der physikalischen Barrieren wie der Haut bzw. mukösen Membranen der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes, erlangt *Candida* Zutritt in den menschlichen Blutkreislauf. Dort wird *Candida* mit einer Reihe von Zellen und löslichen Faktoren des angeborenen Immunsystems konfrontiert, was sowohl in einer protektiven als auch überschießenden Immunzellreaktion mit *Candida* induzierter Sepsis und septischem Schock resultieren kann (Duggan et al. 2015).

Die Oberfläche von *C. albicans* induziert die Aktivierung aller drei Wege des Komplementsystems (Kozel 1996). Die Aktivierung der Komplementkaskade führt zur Freisetzung von Opsoninen wie C3b/C3bi, die *Candida* markieren und deren Eliminierung vermitteln. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Anaphylatoxinen wie C3a und C5a. Diese wirken zusammen mit den von Immunzellen produzierten Zytokinen und Chemokinen als Chemoattraktoren und initiieren damit die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen an den Infektionsherd (Luo et al. 2013). Neben epithelialen und endothelialen Zellen sowie NK-Zellen übernehmen die sogenannten Phagozyten eine wichtige Aufgabe bei der erfolgreichen Beseitigung von *Candida*. Zu den „professionellen Phagozyten“ gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (Romani 2004, Blanco und Garcia 2008). Neutrophile Granulozyten gelten dabei als Hauptakteure bei der Bekämpfung von *C. albicans*, wobei eine Reihe verschiedener Rezeptoren und diverse Effektormechanismen an der Erkennung und Eliminierung des Pilzes beteiligt sind.

2.4.1 Interaktion von Immunzellen mit *Candida* spp.

Grundlage für eine effektive Bekämpfung und Beseitigung von Mikroben ist die erfolgreiche Erkennung der Pathogene. Nicht-opsonisierte Mikroorganismen werden mithilfe spezifischer PRRs (*pattern recognition receptors*) identifiziert. Zu diesen membrangebundenen Rezeptoren gehören Toll-like Rezeptoren (TLRs), C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLRs) und NOD (*Nucleotid-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLRs). Diese PRRs erkennen für Mikroben charakteristische Moleküle, welche als PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet werden und führen über verschiedene Signalkaskaden zu einer Aktivierung der angeborenen Immunantwort. Jede Immunzelle exprimiert ihr eigenes Arsenal an PRRs, die wiederum in unterschiedlichem Maße an der Erkennung von Pathogenen beteiligt sind. Daher liegt auch die Vermutung nahe, dass je nach Zelltyp unterschiedliche Rezeptoren an der Erkennung von *Candida* beteiligt sind (Netea et al. 2008, Miramon et al. 2013).

In vivo trägt auch die Opsonisierung pathogener Mikroorganismen durch Komplementfaktoren maßgeblich zur Erkennung bei. Hierbei kommt es durch die Bindung verschiedener Liganden an die Komplement- Rezeptoren CR1, CR3 und CR4 zur Initiierung einer antifungalen Aktivität (van Lookeren Campagne et al. 2007). Der auf Neutrophilen exprimierte CR3 vermittelt beispielsweise durch die Bindung der Komplementprodukte C3b und iC3b oder von β -Glukanen die Aufnahme von *C. albicans* (Netea et al. 2008).

Die professionellen Phagozyten besitzen ein Arsenal an Effektormechanismen, mit denen *Candida* bekämpft werden und die sie zu den Hauptakteuren bei der Beseitigung von *Candida* Infektionen machen. Dabei scheint sich die Effektivität der Pathogen-Beseitigung je nach Spezies zu unterscheiden. PMN weisen bei der Bekämpfung von *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* unterschiedliche fungizide Aktivität auf (Miramon et al. 2013). Die Unterscheidung zwischen der Hefe- und filamentösen Wachstumsform von *C. albicans* spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion mit PMN. *C. albicans* Hyphen vermitteln eine morphotypspezifische Aktivierung der PMN, was zu einer gerichteten Motilität und einer schnellen Phagozytose führt. Dagegen werden *C. albicans* Hefen weniger effektiv phagozytiert und rufen keine gerichtete Motilität hervor (Wozniok et al. 2008,

Behnsen et al. 2007). Des Weiteren sind PMN die einzigen Immunzellen, welche die intrazelluläre Filamentierung von *C. albicans* hemmen können (Wozniok et al. 2008, Hünninger et al. 2014). Makrophagen und Dendritische Zellen sind dagegen nicht in der Lage, die intrazelluläre Bildung von *C. albicans* Filamenten zu unterbinden. In diesen Zellen können die Hyphen weiter wachsen und die Zellwand durchdringen, was zum Austritt aus dem Intrazellularraum und zum Absterben der Immunzelle führt (Kurzai et al. 2005, Vylkova und Lorenz 2014). Dieser Evasionsmechanismus schützt *C. albicans* erfolgreich vor dem intrazellulären, stark antimikrobiell wirkenden Milieu.

Vieles weist darauf hin, dass die Interaktion von *C. albicans* und *C. glabrata* mit dem angeborenen Immunsystem beträchtliche Unterschiede aufweist. So konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass eine Konfrontation mit *C. glabrata* zu einer eher milderen, persistierenden Infektion führt, während eine Infektion mit *C. albicans* in einer Hyperinflammation und Sepsis resultieren kann (Jacobsen et al. 2010). Über die Immunzellinteraktion mit *C. glabrata* ist bisher deutlich weniger bekannt als für *C. albicans*. Da *C. glabrata* keine Hyphen ausbilden kann, fehlt dem monomorphen Pilz im Gegensatz zu *C. albicans* ein wichtiger Virulenzfaktor, der sowohl für die Invasivität, Penetranz und Überleben in den Immunzellen wichtig ist. Allerdings konnten Studien belegen, dass *C. glabrata* mehrere Tage im Wirt überleben kann. In immunkompetenten Mäusen wurden *C. glabrata* noch mehrere Tage nach Infektion nachgewiesen. Nach Phagozytose durch Makrophagen können *C. glabrata* beispielsweise intrazellulär überleben und sich sogar vermehren (Kaur et al. 2007, Seider et al. 2011). Die intrazelluläre Replikation kann zum pyroptischen Zelltod der Makrophagen führen, wodurch *C. glabrata* wieder in den Extrazellularraum gelangt. Wie für *C. albicans* beschrieben, scheint diese Immunevasionsstrategie eine Hauptrolle im Infektionsprozess zu spielen. Die Interaktion von *C. glabrata* und PMN ist bisher noch weitestgehend unbekannt.

2.4.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu den polymorphkernigen Leukozyten und stellen mit 50-70% die größte Population der im Blut zirkulierenden Leukozyten dar. Täglich werden bis zu 2×10^{11} Zellen im Knochenmark neu gebildet. Die sich im Blutkreislauf befindenden reifen neutrophilen Granulozyten haben einen mittleren Durchmesser von 10-15 μm , ihr Nukleus ist segmentiert und das Zytoplasma ist mit Granula und sekretorischen Vesikeln angereichert (Borregaard 2010). Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen, die zum Infektionsherd rekrutiert werden. Sie können sich mit Geschwindigkeiten von bis zu 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ fortbewegen und gehören damit zu den schnellsten migrierenden Immunzellen. Verschiedene Stimuli induzieren eine gerichtete Bewegung der neutrophilen Granulozyten zum Infektionsherd. Diese gerichtete Bewegung entlang eines Konzentrationsgradienten wird auch Chemotaxis genannt. Interleukin 8 (IL-8) ist einer der potentesten Chemoattraktoren für neutrophile Granulozyten. IL-8 kann von Neutrophilen selbst produziert und ausgeschüttet werden und führt zur Aktivierung und gerichteten Migration weiterer Immunzellen.

2.4.2.1 Effektormechanismen der PMN

Intra- und extrazelluläre Effektormechanismen tragen zur Beseitigung eindringender Mikroorganismen bei: Hierzu zählt man die Phagozytose, Freisetzung von in Granula enthaltenen Enzymen und antimikrobiellen Substanzen, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Bildung von sogenannten *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Abb. 2).

Bei der Phagozytose handelt es sich um einen aktiven, Rezeptor-vermittelten Prozess, bei dem neutrophile Granulozyten gezielt andere Organismen oder Partikel internalisieren. Sowohl opsonisierte als auch nicht-opsonisierte Partikel können phagozytiert werden, wobei eine Reihe verschiedener Rezeptoren auf der Oberfläche von Neutrophilen die Aufnahme vermitteln. Die dabei entstehende und den Partikel enthaltene Vakuole wird Phagosom genannt. Erst durch die Phagosomenreifung, bei der antimikrobielle Substanzen, ATPasen und der NADPH-

Oxidase-Komplex in das Phagosom aufgenommen werden, erhalten die Phagosomen die Grundausrüstung, um Pathogene abzutöten (Nordenfelt und Tapper 2011). Gleichzeitig ist die Phagozytose auch Voraussetzung zur Antigenpräsentation und bildet damit einen Link zum adaptiven Immunsystem.

Neutrophile Granulozyten besitzen drei Typen von Granula, die pro-inflammatorische und antimikrobielle Proteine enthalten. Die primären (azurophilen) Granula enthalten Myeloperoxidase (MPO), Defensine und Elastase. Laktotransferrin und Lysozym sind Bestandteile der sekundären Granula und Gelatinase ist in den tertiären Granula enthalten (Nathan 2006, Galli et al. 2011, Hager et al. 2010). Durch die Phagozytose werden zahlreiche Signalkaskaden aktiviert, die zur Degranulierung der Granula in den Extrazellularraum führen. Hier wirken die Substanzen zytotoxisch auf Mikroorganismen aber auch auf die Umgebung. Intrazellulär verschmelzen Phagosomen mit den Granula (Lysosomen) und werden daraufhin Phagolysosomen genannt (Herrmann et al. 2007). Innerhalb der Phagolysosomen entsteht somit ein antimikrobielles Milieu und die phagozytierten Substanzen können effektiv mithilfe der antimikrobiellen Peptide und Sauerstoffradikale (ROS) beseitigt werden.

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) können nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten innerhalb der Phagolysosomen produziert und freigesetzt werden. Dieser Prozess wird als respiratorischer oder oxidativer Burst bezeichnet. An der Bildung der Sauerstoffradikale sind mehrere Enzyme beteiligt (Halliwell und Gutteridge 1990, Babior 2000). Das Schlüsselenzym, die NADPH-Oxidase, generiert aus NADPH und Sauerstoff Superoxidanionen, die Ausgangsprodukte für weitere Reaktionen darstellen. Weitere Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) oder die Myeloperoxidase (MPO) aus den azurophilen Granula katalysieren die Produktion von Wasserstoffperoxid bzw. Hypochlorsäure (Hampton et al. 1998). Die daraus gebildeten antimikrobiellen Oxidantien wie Superoxidanionen O_2^- , Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Peroxinitrit $ONOO^-$, Hydroxylanionen OH^- , hypochlorige Säure $HOCl$ oder Nitrylchloride NO_2Cl schädigen DNA, Proteine und Lipide und tragen somit zum Abtöten von Pathogenen bei (Enjalbert et al. 2007).

Die Bildung von NETs beschreibt einen Mechanismus mit dem sowohl Bakterien als auch Pilze extrazellulär abgetötet werden. Dabei rupturiert die Zellwand von neutrophilen Granulozyten und es kommt zu einer massiven Freisetzung von

Chromatin, Proteinen und Histonen. Histone und Proteine führen zum Verlust der Virulenzfaktoren und zum Abtöten des Pathogens. Dabei spielt das Protein Calprotectin eine entscheidende Rolle (Urban et al. 2009). Die Freisetzung von NETs führt zum Absterben des Neutrophilen, wobei dieser Zelltod weder der Apoptose noch der Nekrose entspricht (Brinkmann et al. 2004, Urban et al. 2006b).

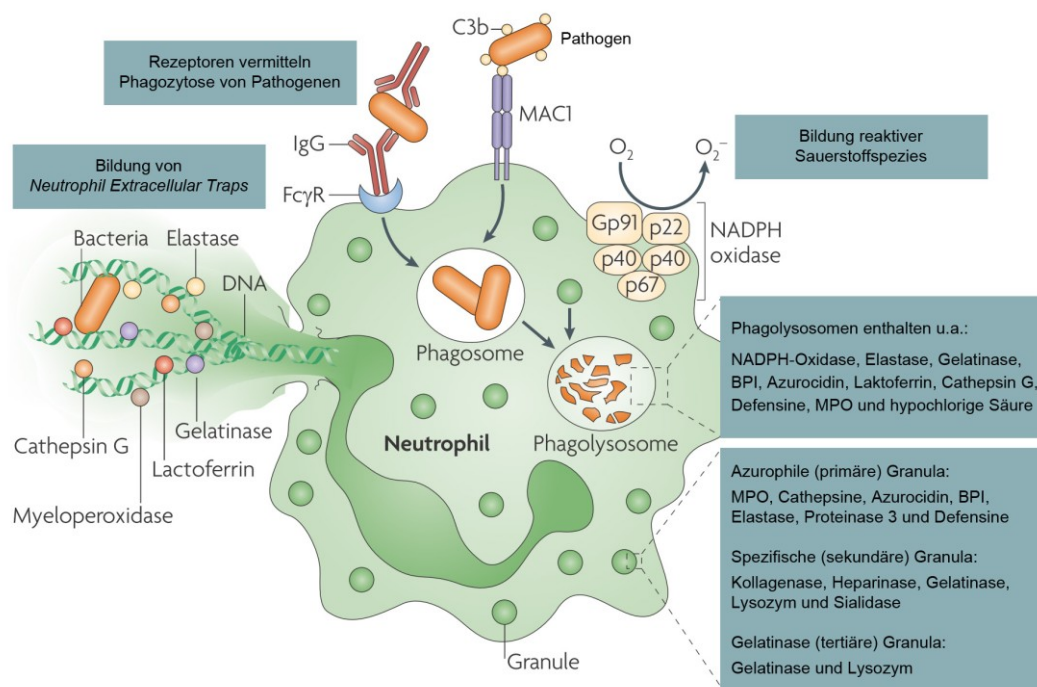


Abbildung 2: PMN Effektormechanismen.

Intra- und extrazelluläre Effektormechanismen der PMN tragen zur Beseitigung von Mikroorganismen bei. Nach Aktivierung kommt es Rezeptor-vermittelt zur Phagozytose der Pathogene, zur Freisetzung von in Granula enthaltenen Enzymen und antimikrobiellen Substanzen, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Modifiziert nach Hickey und Kubes, 2009 (Hickey und Kubes 2009).

2.5 Lebendzellmikroskopie

Lebendzellmikroskopische Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ermöglichen die Visualisierung dynamischer biologischer Zell-Zell und Zell-Mikroben Interaktionen in Echtzeit. Darüber hinaus bietet die Lebendzellmikroskopie die Möglichkeit den Einfluss der räumlichen Umgebung zu untersuchen. Mithilfe von konfokalmikroskopischer Aufnahmen konnten bisher eine Reihe neuer, unentdeckter Mechanismen der Immunzellinteraktion aufgedeckt werden (Bain et al. 2015).

Es wurde bereits belegt, dass PMN *C. albicans* Hyphen phagozytieren, während *C. albicans* Hefen größtenteils ignoriert werden und somit die morphologische Plastizität von *C. albicans* die Immunzellaktivierung beeinflusst (Wozniok et al. 2008). Weiterhin wurde mittels lebendzellmikroskopischer Aufnahmen zum ersten Mal visualisiert, dass NK-Zellen *C. albicans* phagozytieren (Voigt et al. 2014), was zur vollständigen Aktivierung der NK-Zellen beiträgt. Behnsen *et al.* konnten bei der Immunzellinteraktion von PMN und *A. fumigatus* einen sogenannten *Dragging* Mechanismus entdecken und stellten eine räumliche Abhängigkeit der Phagozyten-Aktivität fest (Behnsen et al. 2007).

Kontinuierliche Aufnahmen über mehrere Stunden liefern sowohl räumliche, als auch zeitliche Informationen zu der Dynamik und dem Ablauf biologischer Prozesse. Diese Vielzahl an Informationen kann durch die Entwicklung von bioinformatischen Bilderanalyseverfahren verarbeitet und quantitativ analysiert werden, wodurch einzelne Aspekte der Immunzellinteraktion wie die Migration, Pathogen-Erkennung, Phagozytose, Phagosomenreifung und schließlich das Absterben der Wirtszelle oder des aufgenommenen Pathogens individuell betrachtet werden können. In einer Studie von Lewis *et al.*, in welcher mittels Lebendzellmikroskopie der Phagozytose-Prozess von *C. albicans* durch Makrophagen zeitaufgelöst analysiert wurde, konnte gezeigt werden, dass das Migrationsverhalten durch Zellwandbestandteile von *C. albicans* und die Aufnahmerate durch die morphologische Plastizität sowie ebenfalls Zellwandbestandteile beeinflusst wird. Des Weiteren ist die Zeitspanne zwischen Pathogen Erkennung und erfolgreicher Internalisierung von einer Reihe von Faktoren wie der Hyphenlänge und der räumlichen Orientierung abhängig (Lewis et al. 2012).

Die quantitative Analyse lebendzellmikroskopischer Daten erlaubt eine exakte, objektive Analyse der Immunzellinteraktion. Bislang wird die Bilderanalyse noch häufig sehr zeitintensiv mittels eines manuellen Zelltrack-Verfahrens durchgeführt. Durch die Entwicklung einer vollständig automatisierten Methode zur Segmentierung und zum Zelltracking in Kombination mit einer vollautomatischen Charakterisierung und parameterfreien Klassifizierung von Zelltracks können in Zukunft lebendzellmikroskopische Aufnahmen in großem Ausmaß quantitativ analysiert werden (Mokhtari et al. 2013, Brandes et al. 2015).

3 Ziele der Arbeit

Neutrophile Granulozyten haben als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *Candida* Infektionen. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass verschiedene *Candida* Spezies unterschiedliche Immunreaktionen auslösen können. Speziell die Immunzellinteraktion von PMN mit *C. glabrata* ist bisher nur unzureichend analysiert. Folgende Ziele waren aus diesem Grund Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

- (1) Etablierung der Lebendzellmikroskopie in hoher Bildqualität
- (2) Vergleichende Analyse der Aktivierung von PMN durch *C. albicans* und *C. glabrata*.
- (3) Nutzen der hochaufgelösten Bilderdaten zur Entwicklung von automatisierten Bilderanalyseverfahren.

4 Methoden

4.1 Gewinnung von Blutproben

Peripher-venöses Blut wurde von gesunden freiwilligen Personen gespendet, die der Blutabnahme schriftlich zustimmten. Alle Protokolle wurden durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Jena genehmigt (Genehmigungsnummer 273-12/09).

4.2 Isolierung von neutrophilen Granulozyten

Nach der Blutabnahme in EDTA-Monovetten (Sarstedt) wurde das Blut mit einem Drittel des Volumens mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , PAA) verdünnt. Darauf folgte langsames Überschichten von jeweils 6 ml verdünntem Blut auf 5 ml PolymorphprepTM (Fresenius Kabi Norge AS). Durch Zentrifugation (45 min bei 500x g und Raumtemperatur, ohne Bremse) bildeten sich sechs verschiedene Schichten, wobei sich die Erythrozyten am Boden absetzten. Nach Abtragen der oberen Serum- und Monozytenschicht wurde die darunterliegende PMN-Schicht in ein frisches Falcon überführt, mit einer 0.5%-igen PBS-Lösung verdünnt und für 10 min bei 400x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Um eventuell enthaltene Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellen zweimal für 5 beziehungsweise 3 Minuten in 4°C kaltem ACK-Lysepuffer (Invitrogen) inkubiert. Es folgte jeweils eine zwei-minütige Zentrifugation bei 600x g. Abschließend wurde das Zellpellet in Medium (RPMI1640 (Gibco) plus 5% hitzeinaktiviertes humanes Serum (Typ AB, PAA)) resuspendiert. Die Hitzeinaktivierung des humanen Serums erfolgte für eine Stunde bei 56°C. Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten wurde mithilfe eines Cellometer Auto M10 (Nexcelom Bioscience) bestimmt.

4.3 Überprüfung der Reinheit und Voraktivierung der isolierten PMN

Mithilfe der Markierung zellspezifischer Antigene (PMN: CD66b⁺, Monozyten: CD14⁺, T-Lymphozyten: CD3⁺) durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper konnte die Reinheit der isolierten polymorphkernigen Leukozyten sowie Rückstände von Lymphozyten und Monozyten bestimmt werden. Hierfür wurden jeweils 50 µl der PMN-Suspension in FACS Röhrchen pipettiert und entweder mit dem Antikörper-Mix aus anti-Human CD3-APC, CD14-FITC und CD66b-V450 beziehungsweise als Kontrolle mit den entsprechenden Isotyp-Kontrollen der Antikörper (Tabelle 1) gefärbt. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Proben mit 2 ml CellWash (BD) gewaschen, für 5 min bei 250x g und Raumtemperatur zentrifugiert, wieder in 100 µl CellWash aufgenommen und am Durchflusszytometer (BD FACS Canto II®) gemessen (Abb. 3). Für die Experimente wurden nur Proben mit einer Reinheit der PMN von mindestens 95% verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Untersuchung der PMN-Reinheit

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft
Maus anti-Human CD66b-V450	G10F6	IgM	BD Bioscience
Maus anti-Human CD14-FITC	M5E2	IgG2a	BD Bioscience
Maus anti-Human CD3-APC	SK7	IgG1	BD Biosciences
Maus IgM-V450	G155-288	IgM	BD Bioscience
Maus IgG1-FITC	G155-178	IgG2a	BD Bioscience
Maus IgG1-APC	MOPC-21	IgG1	Biolegend

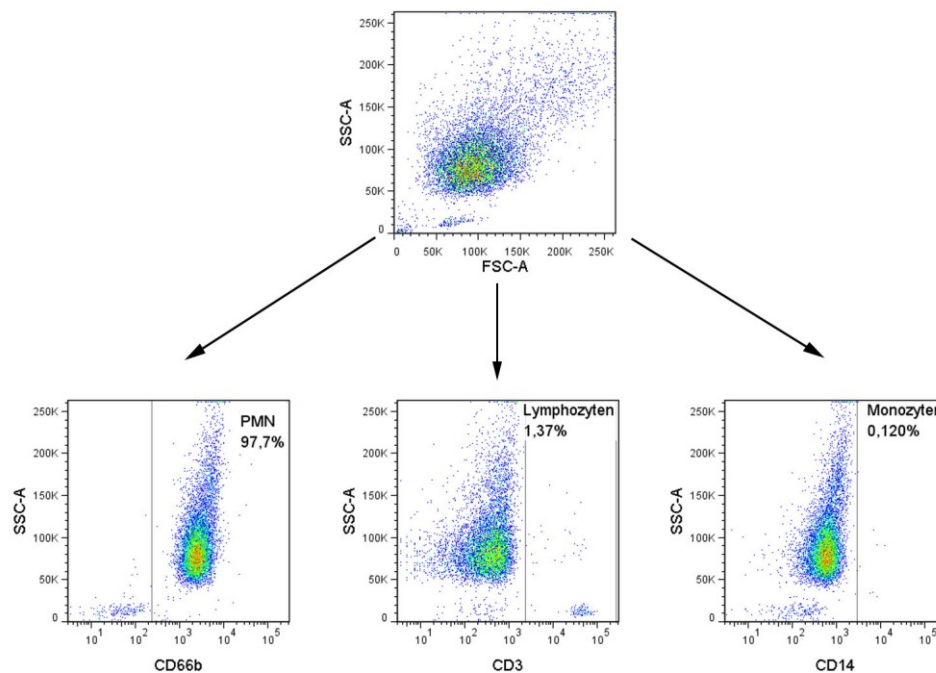


Abbildung 3: Reinheitsüberprüfung der PMN.

Durchflusszytometrische Messung zur Überprüfung der Reinheit der isolierten PMN. Durch die Färbung der PMN-Suspension mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die zellspezifischen Antigene CD66b (PMN), CD14 (Monozyten) und CD3 (T-Lymphozyten) konnten die Anteile der jeweiligen Immunzellen bestimmt werden. CD66b diente ebenfalls zur Überprüfung einer möglichen Voraktivierung der PMN.

4.4 Kultivierung von *Candida*

Die Langzeitkultivierung von *Candida* spp. erfolgte auf YPD-Agarplatten (1% Hefeextrakt, 2% Bakto-Pepton, 2% D-Glukose, 2% Agar), die bei 4°C gelagert wurden. Vor jedem Experiment wurden *Candida* spp. routinemäßig über Nacht in M199 Medium (9.8 g/l M199 Pulver, 35.7 g/l HEPES, 2.2 g/l Natriumhydrogencarbonat), pH4 bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Diese stationäre Kultur wurde vor Versuchsbeginn 1:50 in M199 Medium, pH8 verdünnt und eine Stunde bei 37°C inkubiert, was bei *C. albicans* ein filamentöses Wachstum induzierte. Die Pilze wurden dreimal mit HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Gibco) gewaschen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Germany) durch ein Lichtmikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss) bestimmt. Für die lebendzellmikroskopischen Experimente mit *C. albicans*

Hefen wurden die Pilze aus der stationären Kultur für eine Stunde in M199 Medium, pH4 inkubiert, wodurch *C. albicans* in der Hefeform verharrte. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiterverfahren. In Tabelle 2 sind alle verwendeten *Candida* Stämme dargestellt.

Um *Candida* Zellen nach Konfrontationsversuchen bei durchflusszytometrischen Messungen von den Immunzellen unterscheiden zu können, wurden die Pilzzellen zuvor mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Sigma-Aldrich), einem grün-fluoreszierenden Farbstoff, markiert. Hierfür wurden die *Candida* in 1 ml FITC-HBSS Lösung für 15 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm inkubiert und anschließend dreimal mit HBSS gewaschen, um nicht gebundenes FITC zu entfernen.

4.5 Primäre Konfrontationsexperimente

HBSS (als mock-infizierte Kontrolle) oder 1×10^6 FITC-gefärbte *Candida* wurden in einem 1,8 ml Kryoröhrchen (Nunc) mit jeweils 2×10^6 PMN in 1ml RPMI1640 mit 5% hitzeinaktiviertem humanem Serum konfrontiert. Dies entspricht einem *Candida* : PMN Verhältnis von 1:2 bzw. einem MOI = 0,5. Die Proben wurden bei 37°C auf einem Rollenmischer mit 5 rpm für 20 min, 60 min und 120 min inkubiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

4.6 Analyse von PMN-Oberflächenmarker mithilfe der Durchflusszytometrie

Die Expression von PMN-Oberflächenmarkern wurde mit einem BD FACS Canto II[®] gemessen. Hierfür wurden 100 µl der Proben aus den primären Konfrontationsexperimenten für 20 min mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Zur Detektion der PMN-Aktivierung wurde die Änderung der Oberflächenexposition der beiden Degranulierungsmarker CD66b und CD63 sowie des Fcγ Rezeptors III benutzt (Hünninger et al. 2015), welche nach Aktivierung erhöht bzw. vermindert an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten präsentiert werden. Als Kontrolle erfolgte eine zusätzliche Färbung der Proben mit den entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Isotyp-Kontrollen der Antikörper. Direkt vor

der Messung wurden die Proben mit 500 µl CellWash verdünnt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo 7.6.4 Software. Tabelle 3 enthält alle für dieses Experiment verwendeten Antikörper und Isotyp-Kontrollen.

Tabelle 2: Verwendete *Candida*-Stämme für *in vitro* Experimente

Stamm	Beschreibung	Genotyp	Herkunft
<i>C. albicans</i> SC5314	Wildtyp	<i>C. albicans</i> Wildtyp	B. Hube (Gillum et al. 1984)
<i>C. albicans</i> GFP	<i>C.a.</i> GFP in SC5314	ADH1/adh1::pADH1-GFP-SAT1-ADH1t	A. Häder (Hünniger et al. 2014)
<i>C. albicans</i> BFP	<i>C.a.</i> BFP in SC5314	ADH1/adh1::pADH1-BFP-SAT1-ADH1t	A. Häder (Duggan et al. 2015)
<i>C. albicans</i> ATCC18804	Wildtyp	<i>C. albicans</i> Wildtyp	ATCC (Marakalala et al. 2013)
CABI29	klinisches <i>C.a.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
CABI33	klinisches <i>C.a.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
CABI39	klinisches <i>C.a.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
<i>C. glabrata</i> ATCC2001	Wildtyp	<i>C. glabrata</i> Wildtyp	F. Mühlischlegel (Dujon et al. 2004)
<i>C. glabrata</i> GFP	<i>C.g.</i> GFP in ATCC2001	trp1::pADH1-GFP, leu2::FRT, his1::FRT	K. Kuchler (Seider et al. 2011)
CABI8a	klinisches <i>C.g.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
CABI22	klinisches <i>C.g.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
NRZ#51	klinisches <i>C.g.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
NRZ#52	klinisches <i>C.g.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk
NRZ#64	klinisches <i>C.g.</i> Blutisolat	Wildtyp	NRZMyk

Tabelle 3: Verwendete Antikörper zur durchflusszytometrischen Untersuchung der PMN-Aktivierung.

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft
Maus anti-Human CD66b-V450	G10F6	IgM	BD Bioscience
Maus anti-Human CD63-PE	H5C6	IgG1	BD Bioscience
Maus anti-Human CD16-APC	3G8	IgG1	Biolegend
Maus IgM-V450	G155-288		BD Bioscience
Maus IgG1-PE	MOPC-21	IgG1	Biolegend
Maus IgG1-APC	MOPC-21	IgG1	Biolegend

4.7 Oxidativer Burst Assay

PMN produzieren nach Aktivierung reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die mithilfe eines DCF (Dichlorofluorescein) - Assays gemessen werden können. Der Assay beruht auf der Fähigkeit des nicht-fluoreszierenden Dichlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) durch die Zellmembran der Immunzellen zu diffundieren und von intrazellulären Esterasen deacetyliert zu werden. Das entstehende Dichlorodihydrofluorescein kann die Zelle nicht mehr verlassen und wird im Zytosol durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert, wobei das fluoreszierende Dichlorofluorescein entsteht und den intrazellulären oxidativen Status anzeigt.

Zunächst wurde die 4×10^6 PMN/ml Suspension (in RPMI1640 mit 5% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrome)) bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde mit $1 \mu\text{M}$ DCFH-DA (Sigma) inkubiert. Anschließend startete die PMN-*Candida* Konfrontationsuntersuchung in einer 96-well Mikrotiterplatte (Greiner) durch die Koinkubation von $50 \mu\text{l}$ 4×10^6 PMN/ml und $50 \mu\text{l}$ 2×10^6 *Candida*/ml pro well. Als Positivkontrolle wurden die PMN mit 100 ng/ml PMA (Sigma Aldrich) stimuliert und als Negativkontrolle dienten PMN ohne weiteren Stimulus. Die Fluoreszenz wurde mit einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm bei 37°C über drei Stunden mithilfe eines Tecan Infinite 200 Mikrotiterplatten-

Lesers quantitativ bestimmt. Die ermittelte Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zu der gebildeten Menge an reaktiven Sauerstoffspezies.

4.8 Quantifizierung von sezernierten Proteinen

Für die Quantifizierung von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und chemotaktisch wirkenden Substanzen wurden die Proben nach vier-stündiger Konfrontation von PMN mit *C. albicans* oder *C. glabrata* für 10 min bei 1000x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationen von sezernierten Effektorproteinen in den Überständen der primären Konfrontationsuntersuchungen wurden mithilfe der Luminex Technologie (*MILLIPEX MAP Human Sepsis Magnetic Bead Panel 2* (IL-8), *MILLIPEX MAP Human Magnetic Bead Panel 3* (Laktoferrin, Elastase 2), *MILLIPEX MAP Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2* (MPO); Millipore und *Procarta Immunoassay Kit-Magnetic Beads* (GRO α [CXCL1], ENA-78 [CXCL5], MIG [CXCL9], IP-10 [CXCL10], I-TAC [CXCL11], MCP-1 [CCL2], MIP-1 α [CCL3], MIP-1 β [CCL4], MIP-3 α [CCL20], IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-23, MIF, TNF α , VEGF-A); Affymetrix) bestimmt. Die Durchführung der Experimente erfolgte gemäß der vom Hersteller empfohlenen Gebrauchsanweisung.

4.9 Lebendzellmikroskopie

Die lebendzellmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss LSM 780, Abb. 4) durchgeführt. Das LSM verfügt über einen Rauminkubator mit Heizeinheit und einen CO₂-Zugang, was die Durchführung der Experimente bei physiologischen 37°C und 5% CO₂ ermöglichte. Zur Differenzierung von Pilz- und Immunzellen kamen GFP- bzw. BFP-exprimierende *Candida* Mutanten zum Einsatz. Für die Detektion von toten Zellen wurde Propidiumiodid (PI, Sigma) genutzt. PI ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der die in ihrer Integrität beschädigte Plasmamembran von sterbenden Zellen durchdringt und

intrazellulär in die DNA interkaliert. Dadurch konnten abgetöte *Candida* und tote Immunzellen während der Lebendzellmikroskopie dargestellt werden.

Für die meisten Konfrontationsexperimente wurden 2×10^5 GFP-exprimierende *Candida* in einen Imaging Dish μ Grid (MoBiTec GmbH) vorgelegt, der bereits 1.5 ml vorgewärmtes Medium (RPMI1640 mit 5% hitzeinaktiviertem humanem Serum) enthielt. Hierzu wurden 2×10^5 frisch isolierte PMN in 500 μ l Medium und 2.5 ng/ml Propidiumiodid hinzugefügt (MOI=1). Die Koinfektionsexperimente der PMN mit beiden *Candida* spp. erfolgten durch die Inkubation von jeweils 1×10^5 BFP-exprimierenden *C. albicans* und GFP-exprimierenden *C. glabrata* sowie 2×10^5 PMN. Bei allen Ansätzen wurde der Imaging Dish mit Parafilm (Bemis Neenah) luftdicht verschlossen. Nach Beginn des Experimentes wurden mit dem LSM alle zehn Sekunden Bilder mit einer Auflösung von 2096x2096 Pixel angefertigt, wobei der Focus auf dem Boden des Imaging Dishes lag. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 20x Objektiv (Plan-APOCHROMAT 20x/0.8NA) und der ZEN 2012 Software (Carl Zeiss).



Abbildung 4: LSM 780 von Carl Zeiss mit Rauminkubator und CO₂-Zugang.

Fluoreszenz und Zellinteraktionen wurden mit einem 20x Objektiv (Plan-APOCHROMAT 20x/0.8NA) aufgenommen und mit der ZEN 2012 Software (Carl Zeiss) bearbeitet.

4.10 Analyse der Lebendzellmikroskopie

Die lebendzellmikroskopischen Aufnahmen von jeweils drei PMN-*C. albicans*- beziehungsweise PMN-*C. glabrata*-Konfrontationen wurden mit einer zeitlichen Auflösung von $\Delta t = 0.17$ min über den Zeitraum von einer Stunde aufgenommen. Die Filme dienten zur Analyse der Immunzellaktivierung und Motilität der PMN als Antwort auf die beiden *Candida* spp. Hierfür wurden die PMN mit der frei verfügbaren Software *Image J* (<http://www.imagej.net>) und dem Plugin *MTrackJ* (Meijering et al. 2012) manuell getrackt (Abb. 5) (Mokhtari et al. 2013). Nachdem der Film in *Image J* geladen wurde, erfolgte die Markierung des Zentrums jeder einzelnen Immunzelle in jedem Bild des Films, um deren x- und y- Koordinaten zu bestimmen. Dadurch erhält man für jede Zelle einen individuellen Zelltrack mit deren Position als Funktion über die Zeit. Zellen, die sich noch nicht oder nicht mehr vollständig im Bildausschnitt befanden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Gesamtzahl der betrachteten Zellen in den sechs Videos war 162 für PMN-*C. albicans* und 169 für PMN-*C. glabrata*. Die durchschnittliche Länge der Zelltracks lag bei $197,44 \pm 137,43$ und $189,91 \pm 128,10$ Zeitschritten. Um die Korrektheit der manuellen Bestimmung des PMN-Zentrums zu überprüfen, wurden mehr als 10^3 unterschiedliche Zellpositionen von zwei verschiedenen Personen bestimmt. Hierbei wurde für die Positionsbestimmung der Zellzentren der PMN, die einen mittleren Durchmesser von $11 \mu\text{m}$ haben, nur eine Abweichung von $1,27 \pm 0,75 \mu\text{m}$ festgestellt. Zusätzlich zur Zellposition wurde für jede Immunzelle der Zeitpunkt eines Kontakt-Ereignisses mit einer Pilzzelle innerhalb des Bildabschnittes aufgezeichnet. Für jeden Kontakt wurde außerdem registriert, ob dieser Kontakt in einer erfolgreichen Phagozytose resultierte oder nicht.

Des Weiteren dienten die lebendzellmikroskopischen Aufnahmen dazu, die Motilität der PMN zu analysieren. Die PMN-Migration wird durch das *mittlere Abstandsquadrat* (*Mean Square Displacement* (MSD)) charakterisiert, welches aus den ermittelten Zelltracks berechnet wurde (Michalet 2010). Für den Zelltrack i kann das *Abstandsquadrat* (*Square Displacement*) über alle möglichen Zeitintervalle $n = 1, \dots, N_i - 1$ wie folgt berechnet werden:

$$d_i^2(n) \equiv \frac{1}{N_i - n} \sum_{m=1}^{N_i - n} (\vec{r}_i(m + n) - \vec{r}_i(m))^2. \quad (1)$$

In dieser Formel repräsentiert $\vec{r}_i(m)$ die Vektorposition der Zelle mit der Identifikationsnummer i zum Zeitpunkt m und N_i steht für die Zahl der Zeitpunkte des betrachteten Zelltracks. Der Durchschnitt aus der Gesamtzahl der Zelltracks I ergibt das mittlere Abstandsquadrat (MSD):

$$d^2(n) = \langle d_i^2(n) \rangle_I = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I \left(\frac{1}{N_i - n} \sum_{m=1}^{N_i - n} (\vec{r}_i(m+n) - \vec{r}_i(m))^2 \right). \quad (2)$$

Das gemessene MSD kann mit einem Migrationsmodell verglichen werden, in welchem man annimmt, dass sich PMN durchgängig mittels Zufallsbewegung (*random walk*) fortbewegen. Der *persistent random walk* beschreibt eine zufällige Bewegung, bei der die Zellen ihre Richtung erst nach einer bestimmten Zeitspanne, der Persistenzzeit t_p , ändern. Mittels Fürth's Formel für ein zweidimensionales System (Selmeczi et al. 2005),

$$d_F^2(t) = 4D \left(t - t_p \left(1 - e^{-\frac{t}{t_p}} \right) \right). \quad (3)$$

können die Diffusionskonstante D und die Persistenzzeit t_p über eine Anpassung an die experimentellen Daten ermittelt werden.

Alle mathematischen Analysen wurden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Marc-Thilo Figge (Angewandte Systembiologie, HKI Jena) durchgeführt.

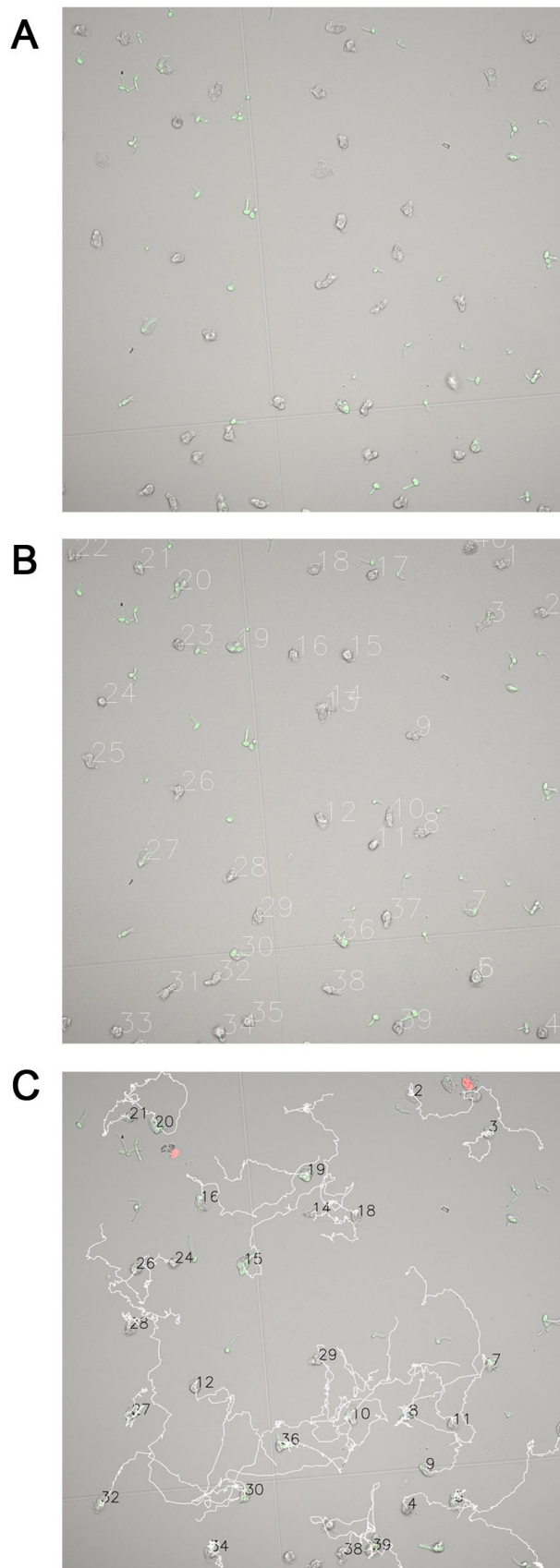


Abbildung 5: Manuelles Zelltracking.

Für eine quantitative Analyse der lebendzellmikroskopischen Aufnahmen (A) wurden die PMN manuell getrackt. Dafür wurde jeder PMN einzeln markiert und über die Dauer von 60 min verfolgt (B), sodass man für jeden PMN einen spezifischen Zelltrack erhält (C), der Informationen über den zurückgelegten Weg und über das Phagozytose-Verhalten der PMN enthält.

4.11 Software

Durchflusszytometrische Daten wurden mit der BD FACS Diva™ beziehungsweise der FlowJo 7.6.4 Software ausgewertet. Die Erstellung der Graphiken erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.

4.12 Statistische Analyse

Die Analyse der Daten erfolgte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten, die mit Zellen von unterschiedlichen Blutspendern durchgeführt wurden. Die Ergebnisse repräsentieren arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t -Test berechnet und ist in den Graphiken durch Sterne gekennzeichnet: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

5 Ergebnisse

5.1 *C. albicans* und *C. glabrata* induzieren eine unterschiedliche Aktivierung der primären PMN

Um die Aktivierung von PMN durch *C. albicans* und *C. glabrata* zu untersuchen, wurden primäre PMN mit beiden *Candida* spp. konfrontiert und deren Effektormechanismen quantifiziert. Dabei wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern und die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und chemotaktisch wirkenden Substanzen gemessen.

Sowohl *C. albicans* als auch *C. glabrata* induzierten im Verlauf der Konfrontation einen oxidativen Burst in PMN und führten zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Abb.6). Für *C. albicans*-infizierte PMN konnten nach 20 min erstmals diskret erhöhte ROS-Level ($107,0 \pm 8,6\%$) im Vergleich zur mock-infizierten Kontrolle (auf 100% gesetzt) nachgewiesen werden. Im Verlauf der Koinkubation stieg der oxidative Burst weiter an und resultierte in einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Level auf $248,2 \pm 67,8\%$ nach 60 min und $614,2 \pm 203,9\%$ nach 120 min. Im Vergleich zu *C. albicans* führte die Konfrontation von PMN mit *C. glabrata* zu einer langsameren Initiierung des oxidativen Bursts. Für die beiden frühen Zeitpunkte konnte für *C. glabrata* keine (20 min p.i.) bzw. nur eine geringe ROS-Bildung (60 min p.i.: $118,9 \pm 7,0\%$, $P < 0,01$ im Vergleich zu PMN-*C. albicans*) festgestellt werden. Auch nach 120 min zeigte sich für die Koinkubation von PMN mit *C. glabrata* ($324,0 \pm 77,0\%$, $P < 0,05$) eine signifikant niedrigere Produktion von ROS als für die Konfrontation mit *C. albicans*.

Neben der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kommt es nach Aktivierung der PMN zur Verschmelzung der neutrophilen Granula mit der Zellmembran und damit zur Freisetzung der enthaltenen Substanzen. Dabei werden Aktivierungsmarker wie CD66b, ein Membranprotein der sekundären Granula, und CD63, welches Bestandteil der primären Granula ist, vermehrt an der Oberfläche präsentiert. Gleichzeitig resultiert die Aktivierung in einer verminderten Oberflächenpräsentation von CD16.

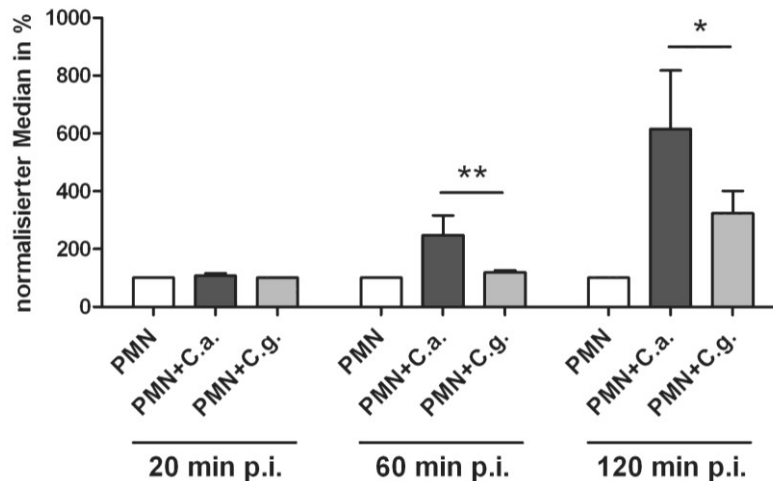


Abbildung 6: *C. albicans* induziert eine stärkere ROS-Produktion als *C. glabrata*.

Primäre PMN wurden mit Kontrollmedium (mock-infiziert, weiße Balken), *C. albicans* (dunkelgraue Balken) oder *C. glabrata* (hellgraue Balken) bei einem MOI=0,5 konfrontiert. Dabei wurde die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der PMN bestimmt, indem die DCF-Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Die Produktion der ROS wurde auf die basalen Level der mock-infizierten PMN zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert (auf 100% gesetzt). Die ROS-Level wurden für die Zeitpunkte 20 min, 60 min und 120 min *post infection* bestimmt. Die Balken zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens vier unabhängigen Experimenten mit isolierten PMN unterschiedlicher Blutspender, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Die Analyse des Oberflächenphänotyps von PMN nach Konfrontation mit *C. albicans* oder *C. glabrata* verdeutlichte, dass nur PMN aktiviert waren, die mit Pilzzellen assoziierten. PMN, die keinen Kontakt zu *Candida* hatten, zeigten dieselbe Expression der Oberflächenmarker wie PMN der mock-infizierten Probe. Nach 60 min Konfrontation konnten sowohl für PMN, die mit *C. albicans* als auch mit *C. glabrata* assoziiert waren, eine vermehrte Oberflächenpräsentation von CD66b und CD63 nachgewiesen werden (Abb. 7A). Eine quantitative Analyse der Oberflächenmarker (Abb. 7C) belegte allerdings eine signifikant stärkere Aktivierung der PMN in Gegenwart von *C. albicans* (CD63: $496,2 \pm 77,1\%$ und CD66b: $354,4 \pm 78,3\%$) als durch *C. glabrata* (CD63: $247,3 \pm 45,5\%$ und CD66b: $150,7 \pm 41,2\%$). In Übereinstimmung hiermit ergab sich für CD16 eine signifikant schwächere Änderung der Oberflächenpräsentation nach Phagozytose von *C. glabrata* ($89,4 \pm 6,8\%$) als von *C. albicans* ($44,2 \pm 5,5\%$). Die 120-minütige Konfrontation führte zu einer weiteren Zu- bzw. Abnahme der Aktivierungsmarker, wobei die Konfrontation mit *C. glabrata* weiterhin in einer verzögerten und im Ausmaß geringeren Änderung der Oberflächenpräsentation von CD63, CD66b und CD16 resultierte (Abb. 7B).

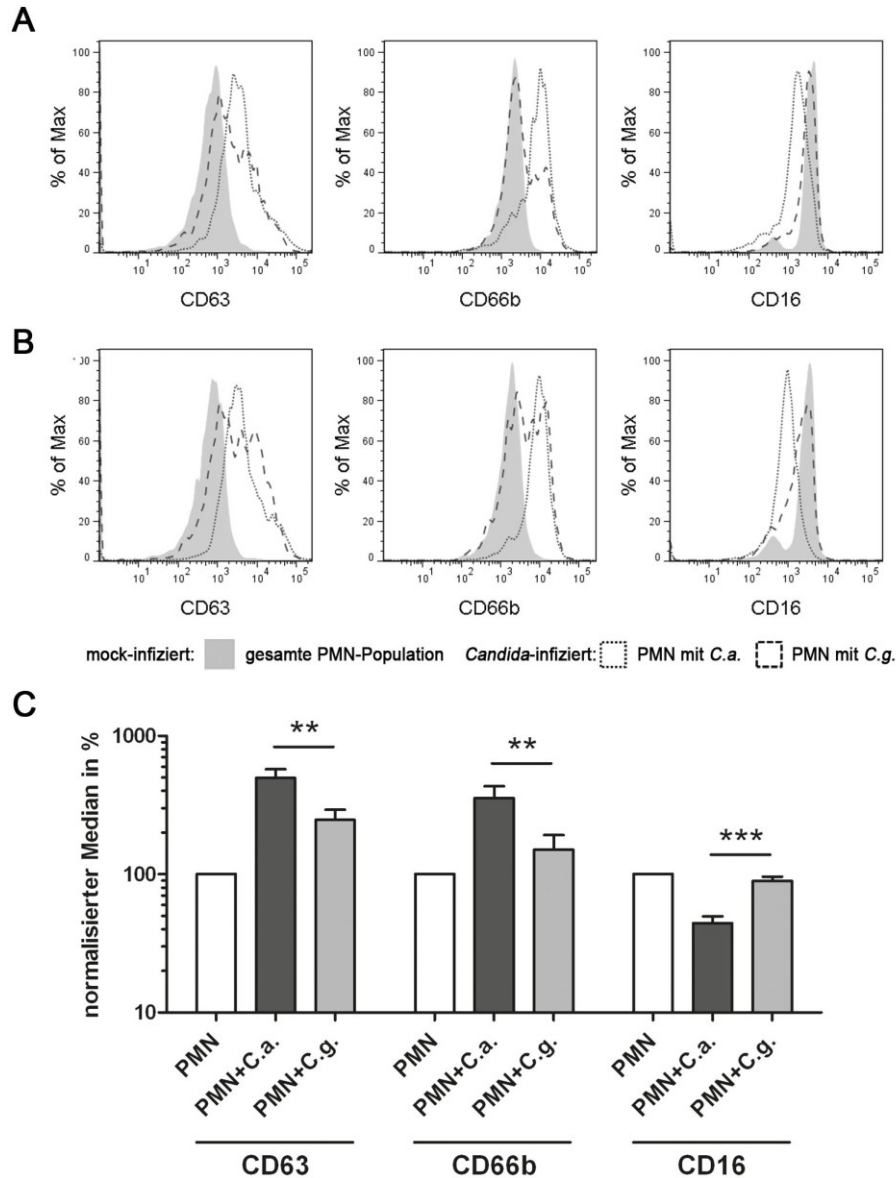


Abbildung 7: *C. albicans* induziert eine stärkere Aktivierung der PMN als *C. glabrata*.

Primäre PMN wurden mit Kontrollmedium (mock-infiziert), *C. albicans* oder *C. glabrata* bei einem MOI=0,5 konfrontiert und auf die Oberflächenpräsentation von PMN-Aktivierungsmarkern untersucht. Die Änderung der Oberflächenlevel von CD63, CD66b und CD16 wurde nach (A) 60 min und (B) 120 min Konfrontation mit *C. albicans* (gepunktete Linien) oder *C. glabrata* (gestrichelte Linien) durchflusszytometrisch untersucht und in repräsentativen Histogrammen dargestellt. Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren die basale Expression der mock-infizierten PMN, Linien indizieren PMN, die mit *Candida* assoziiert waren. Die Abbildung zeigt eines von mindestens vier unabhängigen Experimenten mit Zellen von unterschiedlichen Spendern, die alle ein identisches Resultat ergaben. (C) Zusätzlich wurde eine quantitative Analyse aller Oberflächenmarker des 60 min Zeitpunktes durchgeführt. Die Daten zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung und sind auf die basale Expression der Kontroll-PMN (auf 100% gesetzt) normiert, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Unterschiede in der Oberflächenpräsentation der Degranulierungsmarker CD63 und CD66b weisen auf die Freisetzung antimikrobieller Effektorproteine aus den PMN hin. Daher wurden in den Überständen der verschiedenen Konfrontationsansätze die Konzentrationen von Myeloperoxidase (MPO) und Elastase 2, beides Bestandteile der primären Granula, sowie von Laktoferrin (LF) aus den sekundären Granula ermittelt (Abb. 8). Eine niedrige Sekretion der Effektorproteine durch mock-infizierte PMN ist vermutlich auf eine geringe Voraktivierung der PMN durch den Prozess der Isolierung zurückzuführen. Die drei antimikrobiellen Effektorproteine wurden im Vergleich zur mock-infizierten Kontrolle als Antwort auf beide *Candida* spp. vermehrt ausgeschüttet. Allerdings ergab der Vergleich von *C. albicans* und *C. glabrata* quantitative Unterschiede. Für Elastase 2 konnten während der Konfrontation mit *C. albicans* ($356,4 \pm 91,4$ ng/ml) signifikant höhere Level als in Gegenwart von *C. glabrata* ($221,4 \pm 15,0$ ng/ml) nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit wurde auch die Freisetzung von MPO und Laktoferrin durch *C. albicans* (MPO: $919,5 \pm 262,0$ ng/ml, LF: $1448,6 \pm 825,6$ ng/ml) stärker induziert als durch *C. glabrata* (MPO: $642,1 \pm 122,8$ ng/ml, LF: $581,3 \pm 130,6$ ng/ml).

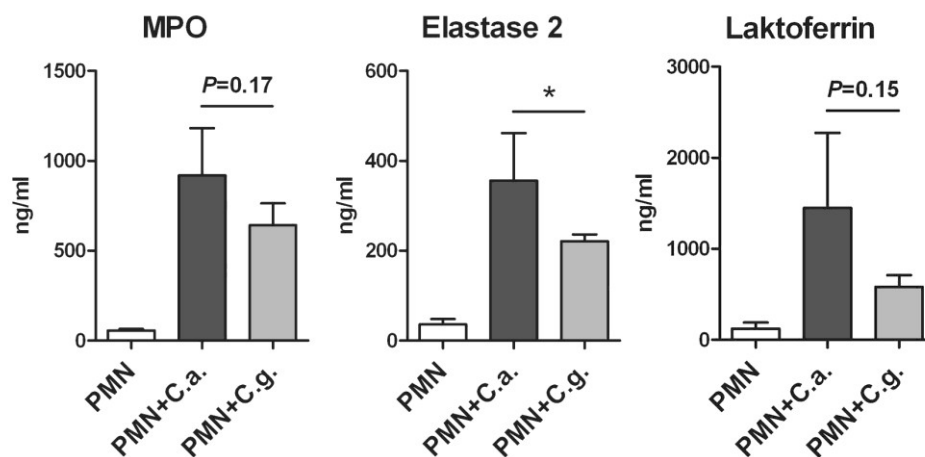


Abbildung 8: *C. albicans* induziert eine stärkere Degranulierung als *C. glabrata*.

In den Überständen primärer PMN-Konfrontationen (4h *post infection*) mit Kontrollmedium (mock-infiziert, weiße Balken), *C. albicans* (dunkelgraue Balken) oder *C. glabrata* (hellgraue Balken) wurden die PMN Effektorproteine Myeloperoxidase (MPO), Elastase 2 und Laktoferrin bestimmt. Die Daten zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit isolierten PMN von unterschiedlichen Blutspendern, * $P < 0,05$.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede der PMN-Aktivierung in Gegenwart von *C. albicans* und *C. glabrata* nicht nur für die verwendeten Laborstämme gelten, wurden zusätzlich weitere vier *C. albicans* und fünf *C. glabrata* Stämme getestet. Dabei handelte es sich um klinische Isolate, die durch das NRZMyk bereitgestellt wurden. Keiner der Stämme zeigte markante Unterschiede gegenüber den Laborstämmen *C. albicans* SC5314 und *C. glabrata* ATCC2001 bezüglich ROS-Bildung und Oberflächenpräsentation von PMN-Aktivierungsmarkern (Abb.9). Dies bedeutet, dass die beobachteten Effekte nicht stamm-spezifisch sind, sondern auf Unterschiede zwischen *C. albicans* und *C. glabrata* zurückgeführt werden können.

Zusammenfassend weisen die Befunde des oxidativen Bursts, der Analyse der Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern sowie der Sekretion von antimikrobiellen Effektorproteinen darauf hin, dass die Konfrontation mit *C. albicans* zu einer stärkeren Aktivierung der PMN führt als sie durch *C. glabrata* induziert wird.

5.2 PMN töten *C. glabrata* effektiver als *C. albicans*

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass PMN unterschiedliche Effektivität in der Abtötung der beiden *Candida* Spezies besitzen. Mithilfe des XTT-Assays konnte nachgewiesen werden, dass *C. glabrata* ($23,2 \pm 3,8\%$) in Anwesenheit von PMN eine signifikant niedrigere metabolische Aktivität hatten als *C. albicans* ($42,5 \pm 12,5\%$) (Duggan et al. 2015). In Übereinstimmung damit zeigte sich in den lebendzellmikroskopischen Aufnahmen, dass *C. glabrata* nach Phagozytose durch PMN effektiver abgetötet wurde als *C. albicans*. Nach zweistündiger Konfrontation waren 69,2% (9 von 13) der phagozytierten *C. glabrata* und lediglich 10,3% (3 von 29) der phagozytierten *C. albicans* intrazellulär abgetötet (Abb.10). Tote *Candida* konnten durch Propidiumiodid identifiziert werden, das die Zellmembran abgestorbener Zellen durchdringt, in die DNA interkaliert und daraufhin ein rot fluoreszierendes Signal emittiert. Der Großteil der nicht-phagozytierten Pilzzellen blieb während der zweistündigen Konfrontation lebendig.

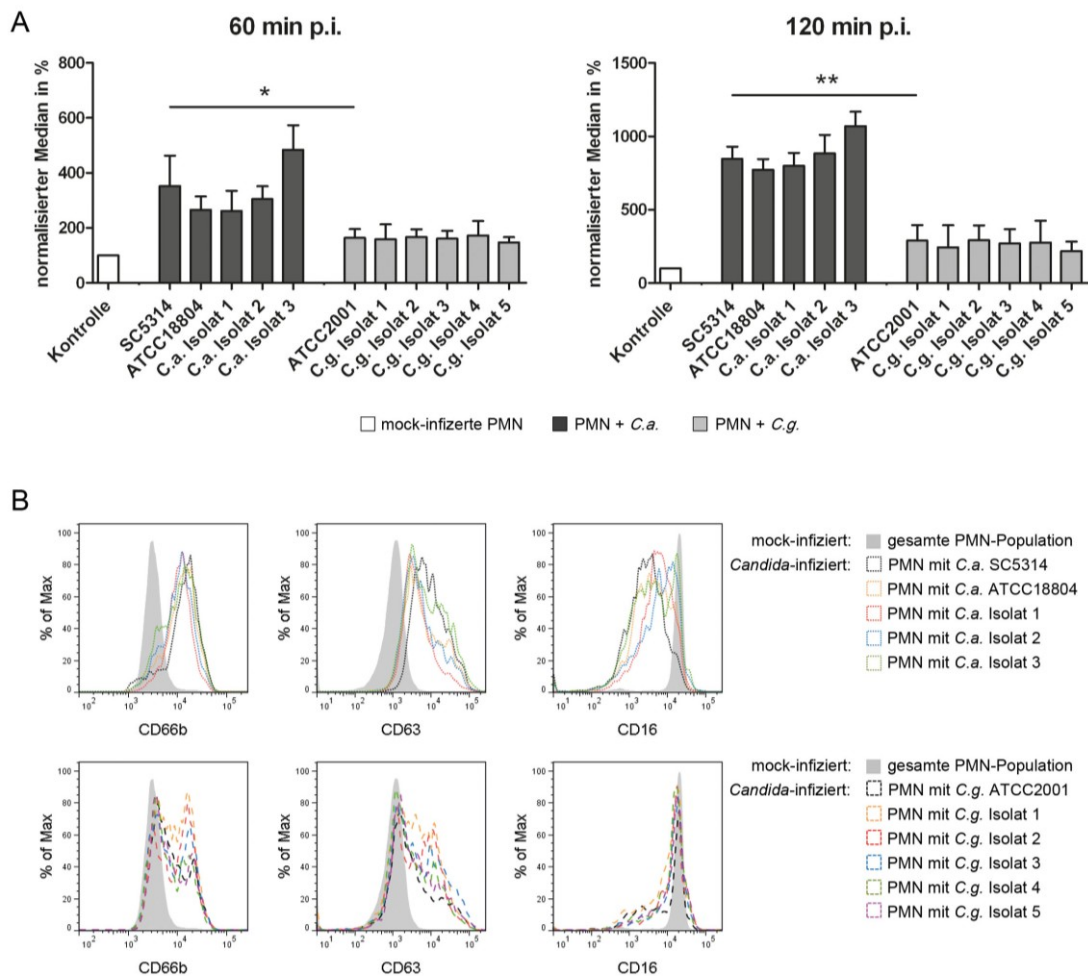


Abbildung 9: Analyse von PMN-Effektormechanismen nach Konfrontation mit verschiedenen Isolaten beider *Candida* spp.

Die Aktivierung der primären PMN konfrontiert mit fünf *C. albicans* und sechs *C. glabrata* Stämmen wurde analysiert, um Stamm-spezifische Unterschiede bezüglich ROS-Bildung und Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern auszuschließen. (A) Die ROS-Bildung aus Konfrontationsversuchen mit *C. albicans* (dunkelgraue Balken) und *C. glabrata* (hellgraue Balken) wurde auf die basale Produktion der mock-infizierten PMN (auf 100% gesetzt, weiße Balken) normiert. Die Balken zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit isolierten PMN unterschiedlicher Blutspender, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (B) Die Änderung der Oberflächenlevel von CD63, CD66b und CD16 wurde nach 60 min Konfrontation mit *C. albicans* (gepunktete Linien) oder *C. glabrata* (gestrichelte Linien) durchflusszytometrisch untersucht und in repräsentativen Histogrammen dargestellt. Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren die basale Expression der mock-infizierten PMN-Kontrolle, Linien indizieren PMN, die mit *Candida* assoziiert sind. Die verschiedenen *Candida* Stämme wurden für eine leichtere Differenzierung farblich dargestellt. Die Abbildung zeigt eines von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Zellen von unterschiedlichen Spendern, die alle ein identisches Resultat ergaben.

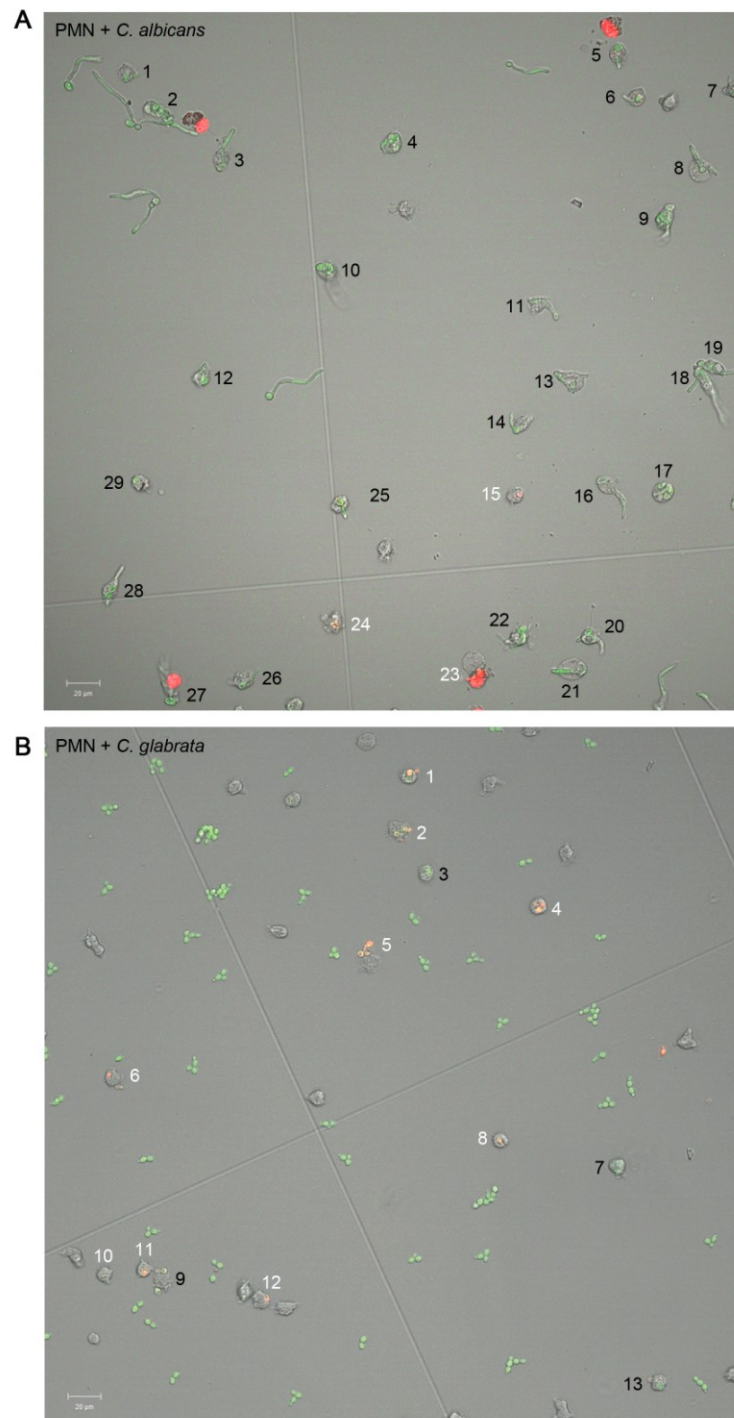


Abbildung 10: *C. glabrata* wird in PMN effektiver abgetötet als *C. albicans*.

Repräsentative Bilder aus lebendzellmikroskopischen Experimenten mit primären PMN (ungefärbt) und entweder GFP-exprimierenden *C. albicans* (oben, grün) oder *C. glabrata* (unten, grün) demonstrieren, dass nach zweistündiger Konfrontation *C. albicans* stärker phagozytiert wurde als *C. glabrata*. Propidiumiodid (PI) wurde zum darstellen toter Zellen dem Medium beigelegt. Während der Großteil der phagozytierten *C. albicans* nach 2 h noch lebendig war, fanden sich bei den durch PMN phagozytierten, intrazellulären *C. glabrata* deutlich mehr abgetötete Zellen. Die Nummern repräsentieren die Anzahl der Phagozytose-Ereignisse im Bildausschnitt; schwarze Nummern stehen dabei für lebende Pilze (PI-negativ) und weiße Nummern für tote Pilze (PI-positiv).

5.3 Unterschiedliche Zytokin-Sekretion der PMN nach Konfrontation mit beiden *Candida* spp.

Zusätzlich zu ihren direkten Effektormechanismen sekretieren PMN eine Reihe inflammatorischer Mediatoren, die weitere Immunzellen beeinflussen können. Die Überstände der verschiedenen Konfrontationsansätze wurden auf die Freisetzung von 18 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen (siehe Materialien & Methoden), für die gezeigt werden konnte, dass sie nach PMN-Aktivierung vermehrt exprimiert und sekretiert werden (Mantovani et al. 2011), untersucht. Hierbei konnte für die sechs Zytokine IL-8, GRO α , MIF, MIP-1 α , MIP-1 β und TNF α eine durch die beiden *Candida* spp. signifikant unterschiedliche Sekretion detektiert werden (Abb.11). IL-8 und GRO α wurden während der Konfrontationen von PMN mit *C. albicans* (IL-8: 2813,1 \pm 1035,8 pg/ml, $P < 0,05$; GRO α : 98,3 \pm 12,2 pg/ml, $P < 0,001$) signifikant stärker ausgeschüttet als in Gegenwart von *C. glabrata* (IL-8: 1727,5 \pm 533,2 pg/ml; GRO α : 59,7 \pm 18,5 pg/ml). Die beiden Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung weiterer PMN an den Infektionsherd und fungieren als PMN-aktivierende Faktoren. Dies kann beispielhaft in Video S6 (Anhang) beobachtet werden. Die lebendzellmikroskopische Aufnahme zeigt die Interaktion von PMN mit *C. albicans*. Die Phagozytose der Pilzzellen durch einen PMN führt dazu, dass immer mehr PMN angelockt werden, um sich an der Immunantwort gegen *C. albicans* zu beteiligen. Auch die Ausschüttung von MIF, einem weiteren pro-inflammatorischen Faktor, der die Migration von Monozyten inhibieren kann, wurde durch *C. albicans* (597,3 \pm 86,7 pg/ml, $P < 0,001$) signifikant stärker induziert als durch *C. glabrata* (313,3 \pm 63,5 pg/ml). Interessanterweise resultierte die Konfrontation von PMN mit *C. glabrata* in signifikant höheren Konzentrationen von MIP-1 α (57,5 \pm 16,8 pg/ml, $P < 0,001$) und MIP-1 β (307,9 \pm 127,2 pg/ml, $P < 0,001$) als in Gegenwart von *C. albicans* (MIP-1 α : 39,3 \pm 14,1 pg/ml, MIP-1 β : 168,4 \pm 92,7 pg/ml). Hierbei handelt es sich um Chemokine, die das Migrationsverhalten von Monozyten steigern können. Außerdem induzierte *C. glabrata* (17,5 \pm 7,6 pg/ml, $P < 0,001$) im Vergleich zu *C. albicans* (7,8 \pm 3,7 pg/ml) eine stärkere Freisetzung von TNF α .

Diese Daten deuten darauf hin, dass PMN als Antwort auf eine Infektion mit den beiden *Candida* spp. unterschiedliche Chemoattraktoren sezernieren, die wiederum eine unterschiedliche Rekrutierung weiterer Immunzellen an den Ort der Infektion induzieren können.

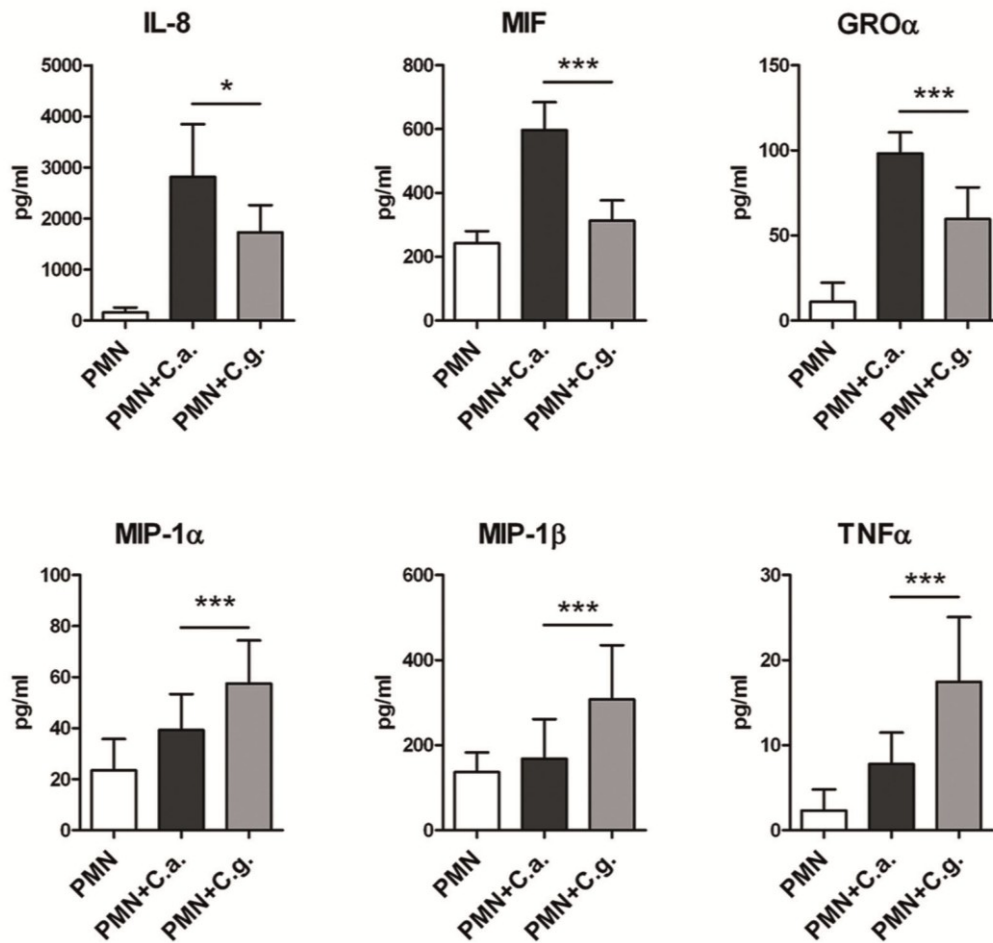


Abbildung 11: *C. albicans* und *C. glabrata* induzieren in PMN eine unterschiedliche Freisetzung von Zytokinen.

Pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wurden in den Überständen nach vier-stündiger Konfrontation von PMN mit HBSS (mock-infiziert, weiße Balken), *C. albicans* (dunkelgraue Balken) oder *C. glabrata* (hellgraue Balken) bestimmt. Für *C. albicans* und *C. glabrata* konnten signifikant unterschiedliche Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, MIF, GRO α , MIP-1 α , MIP-1 β und TNF α gemessen werden. Die Daten entsprechen den arithmetischen Mittelwerten \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit isolierten PMN unterschiedlicher Blutspender, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

5.4 PMN phagozytieren *C. albicans* häufiger als *C. glabrata*

Die zuvor beschriebenen Daten weisen auf Unterschiede in der Interaktion von primären PMN mit *C. albicans* und *C. glabrata* hin, die mithilfe der Lebendzellmikroskopie, welche eine Visualisierung der Pathogen-Wirt-Interaktion in Echtzeit ermöglicht, weiter untersucht werden sollten. Die alleinige Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichte bereits, dass sich die unterschiedliche Aktivierung der PMN auch im Phagozytose-Verhalten der PMN widerspiegelte. Während PMN häufig *C. albicans* phagozytierten, wurden *C. glabrata* nur selten aufgenommen (Abb. 12).

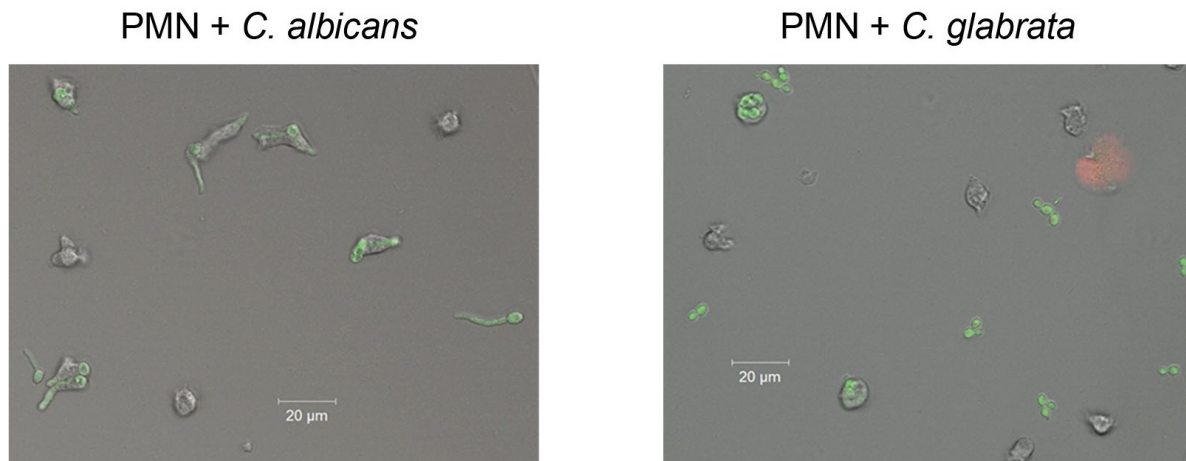


Abb. 12: Lebendzellmikroskopische Aufnahmen der PMN-*Candida*-Interaktionen.

Um die Pathogen-Wirt-Interaktion zu analysieren, wurden lebendzellmikroskopische Experimente mit GFP-exprimierenden *Candida* (grün) bei einem MOI von 1 durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen nach 60-minütigen Konfrontationen, die verdeutlichen, dass PMN (ungefärbt) effektiv *C. albicans* (links) und in geringerem Ausmaß *C. glabrata* (rechts) phagozytierten. Die rote Fluoreszenz zeigt die Propidiumiodid-Färbung von toten Zellen.

Für eine quantitative Analyse der PMN-Aktivierung durch die beiden *Candida* Spezies wurden alle PMN der lebendzellmikroskopischen Aufnahmen über den gesamten Konfrontationszeitraum von 60 min getrackt. Informationen zur zeitlichen und räumlichen Orientierung der PMN und zu Kontakt- und Phagozytose-Ereignissen ermöglichten die Analyse der PMN-Motilität sowie der Phagozytose-Häufigkeit und -Frequenz.

Während der Konfrontation von PMN und filamentösen *C. albicans* Zellen zeigte sich eine schnelle Interaktion zwischen PMN und *C. albicans*, die in einer effektiven Aufnahme der Pilzzellen resultierte (Video S1). Nach 60 min hatten $67,1 \pm 21,6\%$ aller PMN mindestens einmal *C. albicans* phagozytiert (Abb. 13A). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn *C. albicans* Hefezellen mit PMN konfrontiert wurden (Video S2). Die Phagozytose der Hefezellen begann zwar zeitlich verzögert, startete aber unverzüglich mit der rasch einsetzenden Filamentierung von *C. albicans*. Dies führte zu vergleichbaren Phagozytose-Raten wie für die *C. albicans* Filamente und stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein (Sasse et al. 2013, Wozniok et al. 2008). Im Gegensatz dazu zeigte während der 60-minütigen Konfrontation mit *C. glabrata* nur eine Minderheit der PMN ($17,8 \pm 5,1\%$, $P < 0,05$) eine erfolgreiche Phagozytose (Abb. 13A, Video S3). Die quantitative Analyse des zeitlichen Verlaufs der Phagozytose-Ereignisse machte deutlich, dass die Aufnahme von *C. glabrata* zufällig verteilt und über die gesamte Dauer von 60 Minuten erfolgte. Innerhalb der ersten 20 min fanden $31,1 \pm 6,3\%$ aller Phagozytose-Ereignisse statt (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu erfolgten in diesem Zeitraum bereits $78,2 \pm 5,1\%$ ($P < 0,001$ verglichen mit PMN-*C. glabrata*) der Phagozytose-Ereignisse von *C. albicans*. Bei der Analyse der Phagozytose-Häufigkeit pro PMN konnte festgestellt werden, dass während der Konfrontation von PMN mit *C. albicans* $86,8 \pm 6,7\%$ der phagozytierenden PMN einmal Pilzzellen aufnahmen verglichen zu PMN, die zweimal ($10,1 \pm 6,4\%$) oder dreimal ($2,8 \pm 3,1\%$) phagozytierten (Abb. 13C). In Gegenwart von *C. glabrata* phagozytierten $78,8 \pm 18,4\%$ der PMN nur einmal, während $21,1 \pm 18,4\%$ der PMN noch ein weiteres Mal eine Pilzzelle aufnahmen.

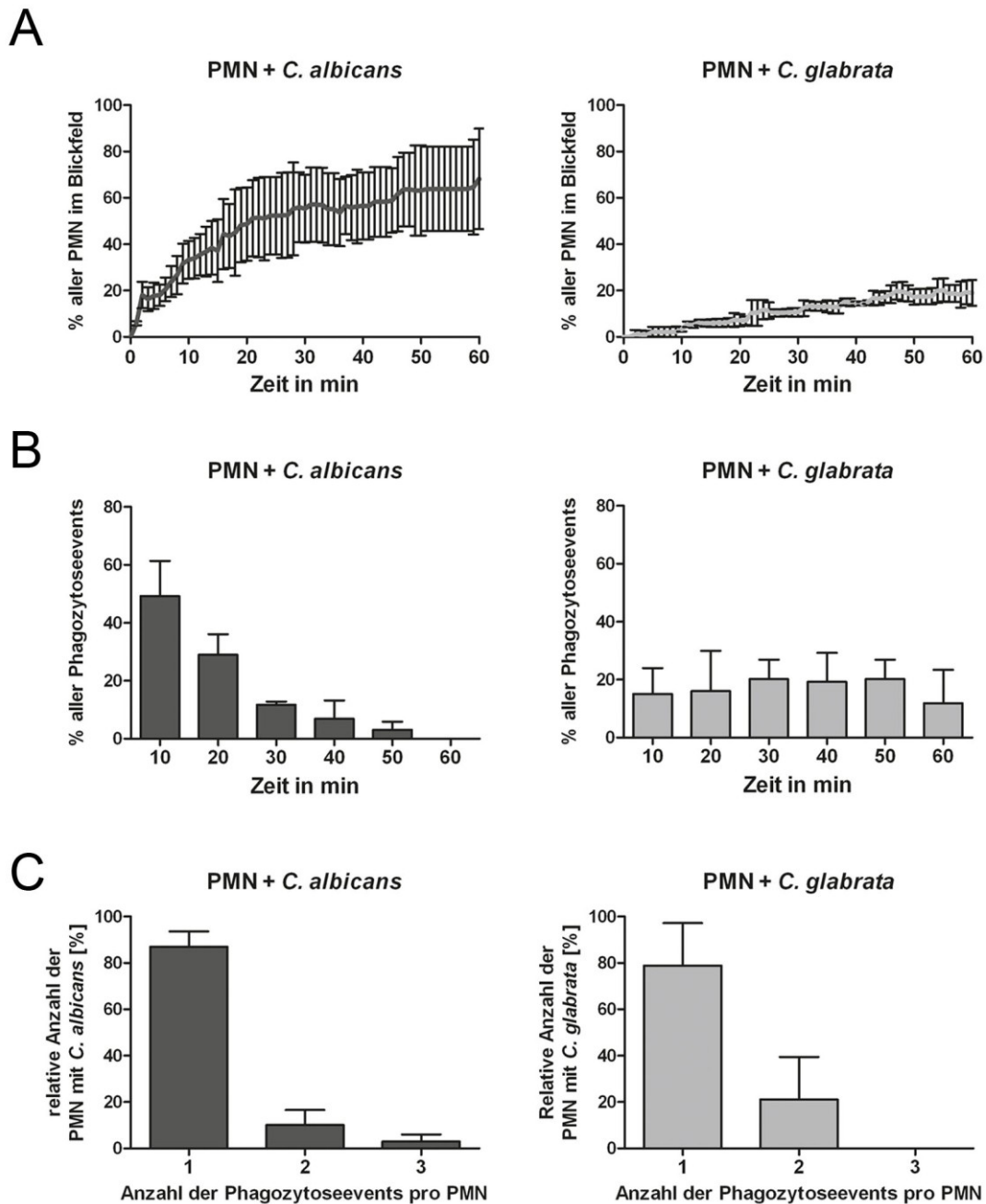


Abbildung 13: PMN phagozytieren *C. albicans* häufiger als *C. glabrata*.

Um die Pathogen-Wirt-Interaktion zu analysieren, wurden lebendzellmikroskopische Experimente mit GFP-exprimierenden *Candida* (grün) bei einem MOI von 1 durchgeführt. Für *C. albicans* und *C. glabrata* wurden jeweils drei unabhängige Experimente mit PMN von unterschiedlichen Spendern durchgeführt. (A-C) Die PMN aller lebendzellmikroskopischen Experimente wurden manuell getrackt und erlauben dadurch eine quantitative Analyse der Phagozytose-Ereignisse. (A) Der prozentuale Anteil der PMN, die während der 60-minütigen Konfrontation *C. albicans* (links, dunkelgraue Linie) bzw. *C. glabrata* (rechts, hellgraue Linie) phagozytierten, wurde im Verhältnis zu der Gesamtheit aller PMN im Blickfeld (auf 100% gesetzt) berechnet. (B) Die Analyse der Phagozytose-Häufigkeit zu bestimmten Zeitpunkten zeigte, dass *C. albicans* (links) vorwiegend in den ersten 20 min phagozytiert wurde, während die Phagozytose von *C. glabrata* (rechts) durch PMN zufällig verteilt während der 60-minütigen Konfrontation stattfand. (C) Die Balken geben Aufschluss über die Anzahl der Phagozytose-Ereignisse pro PMN. Die Balken von A-C stellen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung dar.

5.5 Koinkubation von PMN mit beiden *Candida* spp. resultiert in keiner veränderten Aufnahme von *C. glabrata*

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Entwicklung der Lebendzellmikroskopie war die Etablierung von Konfrontationsuntersuchungen mit PMN und zwei verschiedenen Pathogenen. Neben GFP-exprimierenden *C. glabrata* wurden BFP-exprimierende *C. albicans* verwendet, was einerseits eine einfache visuelle Differenzierung der beiden Pathogene ermöglicht und andererseits eine wichtige Voraussetzung für die spätere Analyse der lebendzellmikroskopischen Aufnahmen mittels automatisierter Bilderanalyse darstellt. Mit diesen Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob sich durch die Gegenwart von *C. albicans*, welche neben der hohen Phagozytose-Rate auch zu einer starken PMN-Aktivierung führen, die Aufnahme von *C. glabrata* durch die PMN ändert. Allerdings zeigte sich, dass auch während der Koinkubation beider Pathogene mit PMN die Phagozytose von *C. albicans* durch die Immunzellen bevorzugt wurde (Video S4, Abb. 14). Während *C. albicans* Zellen zügig und effektiv von PMN aufgenommen wurden, verblieb die Mehrheit der *C. glabrata* Zellen nach 60 min Konfrontation extrazellulär.

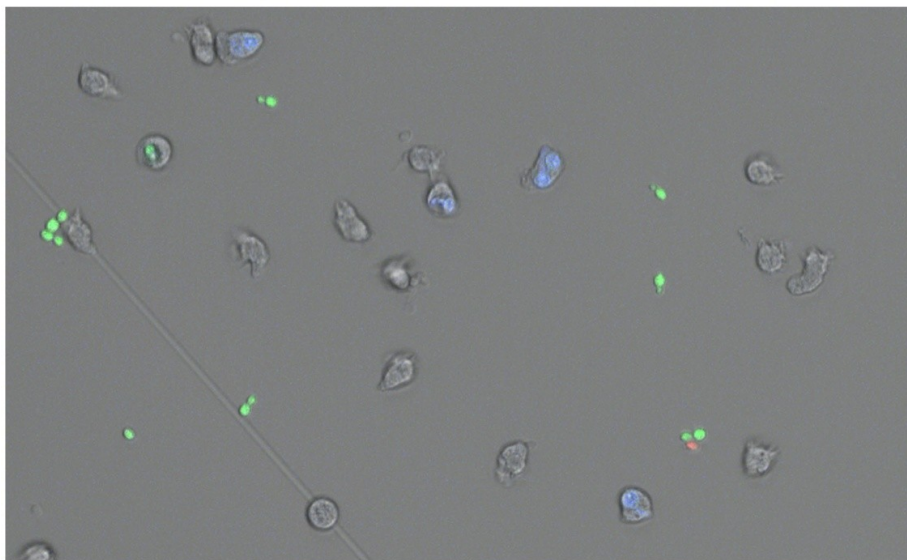


Abbildung 14: Koinkubation von PMN mit *C. albicans* und *C. glabrata*.

Repräsentative lebendzellmikroskopische Aufnahme der Koinkubation von GFP-exprimierenden *C. glabrata* (grün), BFP-exprimierenden *C. albicans* Filamenten (blau) und PMN (ungefärbt). Propidiumiodid wurde dem Medium zugefügt, um tote Zellen (rot) darzustellen. Während *C. albicans* Filamente effizient von PMN phagozytiert wurden, verblieb der Großteil der *C. glabrata* Zellen trotz der Anwesenheit von *C. albicans* extrazellulär.

5.6 *C. glabrata* werden häufiger kontaktiert, aber weniger phagozytiert

Die Häufigkeit der Kontakte zwischen PMN und den *Candida* Spezies wurde quantifiziert, um die physikalische Interaktion und deren Konsequenz genauer zu analysieren (Abb. 15). PMN, die mit *C. albicans* assoziiert waren, kontaktierten die Pilzzellen im Durchschnitt $1,31 \pm 0,15$ Mal pro Stunde (Abb. 15A). Die Mehrzahl der Kontakte zwischen PMN und *C. albicans*, nämlich $69,7 \pm 8,7\%$ resultierten in einer erfolgreichen Phagozytose (Abb. 15B). Die Analyse der Koinkubation von PMN und *C. glabrata* zeigte, dass ein Kontakt zwischen PMN und *C. glabrata* weniger wahrscheinlich in der Aufnahme der Pilzzelle resultierte. Allerdings war die niedrige Phagozytose von *C. glabrata* nicht auf einen Mangel an Kontakten zwischen PMN und den Pilzzellen zurückzuführen. Tatsächlich zeigte sich sogar, dass *C. glabrata* ($2,16 \pm 0,18$ Mal pro Stunde) signifikant häufiger kontaktiert wurde als *C. albicans* (Abb. 15A). Insgesamt lag die Wahrscheinlichkeit, dass der Kontakt zwischen *C. glabrata* und PMN in einer erfolgreichen Phagozytose endete nur bei $11,7 \pm 1,7\%$ (Abb. 15B). Weitere Analysen identifizierten die Unabhängigkeit des Kontakt-Phagozytose-Verhältnisses von der Infektionsdosis: Neben der erhöhten Phagozytose-Rate während der Konfrontation von PMN mit *C. glabrata* bei einem MOI von 5 (Abb. 15A+B, Video S5), nahm ebenso die Anzahl der Kontakte zwischen PMN und *C. glabrata* stark zu und resultierte in $2,26 \pm 0,09$ Kontakten pro *Candida* innerhalb der 60-minütigen Konfrontation. Infolgedessen blieb die Phagozytose-Wahrscheinlichkeit nach Kontakt weiterhin niedrig ($13,2 \pm 2,1\%$) und zeigte keine Veränderung gegenüber der PMN-*C. glabrata* Konfrontation bei einem MOI von 1. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Phagozytose-Wahrscheinlichkeit nach einem Kontakt zwischen Pilz und Immunzelle signifikant niedriger für *C. glabrata* als für *C. albicans* ist.

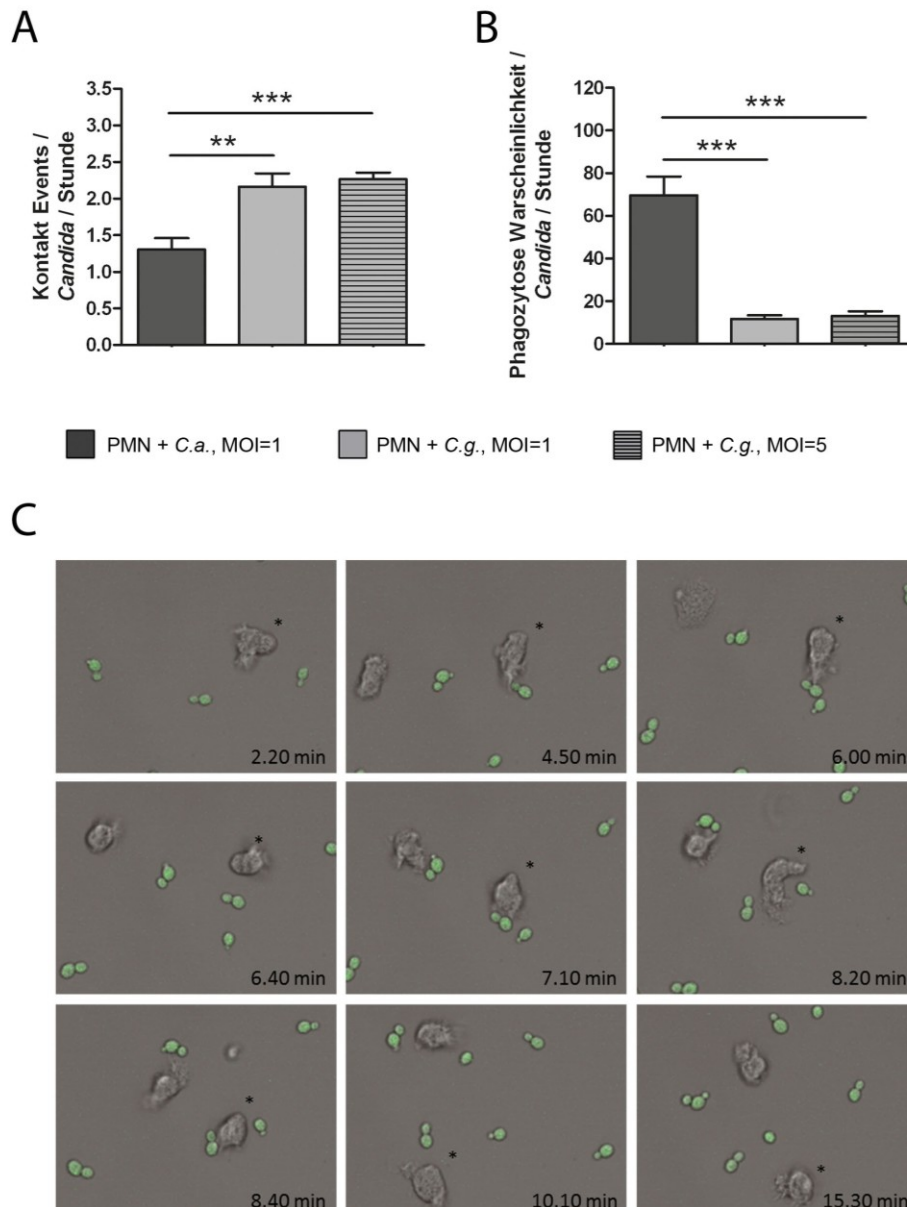


Abbildung 15: *C. glabrata* werden häufig kontaktiert, aber selten phagozytiert von PMN.

Lebendzellmikroskopische Aufnahmen der Koinkubationen von PMN mit *C. albicans*, MOI=1 (dunkelgrauer Balken), *C. glabrata*, MOI=1 (hellgrauer Balken) und *C. glabrata*, MOI=5 (hellgrauer, gestreifter Balken) wurden manuell analysiert und die Kontakte zwischen PMN und *Candida* Zellen sowie die Phagozytose durch PMN ermittelt. (A) Die Balken repräsentieren die Kontakte zwischen PMN mit entweder *C. albicans* oder *C. glabrata* pro *Candida* und pro Stunde. *Candida*, die innerhalb der Stunde nicht kontaktiert wurden, wurden von der Analyse ausgeschlossen. (B) Die Balken zeigen die Wahrscheinlichkeit von *C. glabrata* oder *C. albicans* nach Kontakt mit einem PMN, erfolgreich phagozytiert zu werden. *C. glabrata* wurde signifikant häufiger kontaktiert als *C. albicans*. Allerdings war die Wahrscheinlichkeit, dass ein Kontakt zu einer erfolgreichen Phagozytose führt, signifikant höher für *C. albicans*. Die Balken zeigen arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit primären PMN von unterschiedlichen Spendern, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. (C) Repräsentative Bilder aus lebendzellmikroskopischen Aufnahmen von PMN konfrontiert mit GFP-exprimierenden *C. glabrata* (grün) verdeutlichen die ineffektive Aufnahme der Pilzzellen. Der mit * markierte PMN kontaktierte innerhalb des gezeigten Zeitraumes von insgesamt 15 min dreimal dieselbe *C. glabrata* Zelle, ohne diese zu phagozytieren.

5.7 *C. albicans* induziert eine stärkere Motilität in PMN als *C. glabrata*

Die manuellen Zelltracks der PMN wurden anhand ihres lokalen Migrationsverhaltens analysiert. Dies sollte Aufschluss über ein möglicherweise Pathogen-induziertes Migrationsverhalten der PMN geben. Die *mean square displacement* (MSD) Kurven wurden in Abhängigkeit der Zeit nur für die PMN berechnet, die im Verlauf des Konfrontationsassays auch phagozytierten. Hierbei wurde nur der Zeitraum bis zur Phagozytose analysiert, weil PMN nach der Pilzaufnahme ihre Migrationsgeschwindigkeit dramatisch reduzieren. Dies erlaubte es uns, die Motilität unabhängig von der Phagozytoserate zu betrachten (Abb. 16). Die Daten wurden durch Fürth's Formel angepasst, die einen *persistent random walk* unterstellt. Dadurch konnte die Diffusionskonstante und die zugehörige *persistence time* - also die mittlere Zeit während der die Zellen ihre Migrationsrichtung beibehalten - berechnet werden. Für die Konfrontation von PMN mit *C. albicans* ergaben sich eine *persistence time* von $t_p = 1,1$ min und die Diffusionskonstante $D = 95 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Beide Werte waren deutlich geringer für PMN in Gegenwart von *C. glabrata* ($t_p = 0,7$ min und $D = 41 \mu\text{m}^2/\text{min}$). Quantitative Unterschiede der Diffusionskonstante wurden mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet und es konnte die Signifikanz der Unterschiede in den Ergebnissen nachgewiesen werden. Die Signifikanz wurde für die jeweiligen Werte der beiden *MSD* Kurven in jedem Zeitpunkt berechnet und miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde durch die Anpassung von Fürth's Formel an die Mittelwerte \pm Standardabweichung der *MSD* Kurven ein unteres und oberes Limit in der Variation der Diffusionskonstante bestimmt. Die Variabilität der Diffusionskonstante war für die Konfrontation von PMN mit *C. albicans* zwischen $67 \mu\text{m}^2/\text{min} \leq D \leq 135 \mu\text{m}^2/\text{min}$. Diese zeigte einen deutlichen Unterschied zur PMN-*C. glabrata* Konfrontation, bei der sich eine Variabilität zwischen $26 \mu\text{m}^2/\text{min} \leq D \leq 57 \mu\text{m}^2/\text{min}$ ergab.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass PMN in Gegenwart von *C. glabrata* eine geringere Motilität hatten, als während der Konfrontation mit *C. albicans*. Dies deutet darauf hin, dass *C. albicans* die Migration der PMN signifikant stärker beeinflusst als *C. glabrata*.

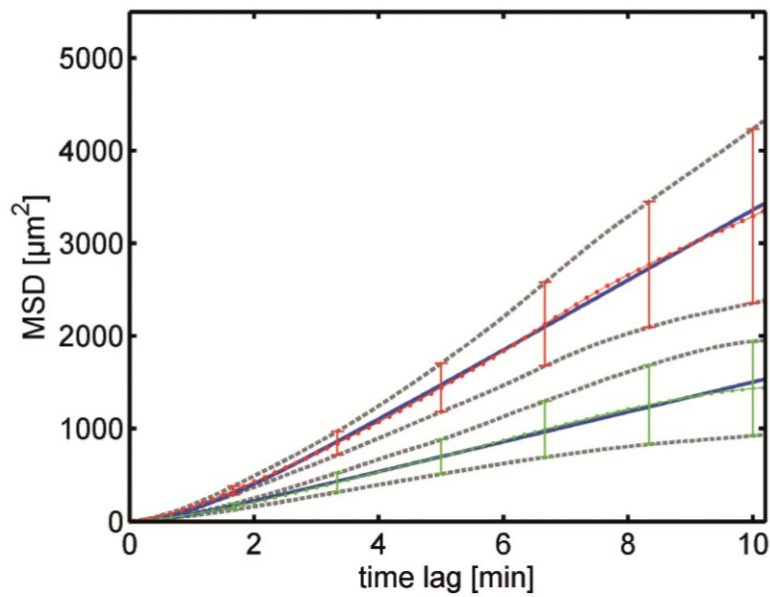


Abbildung 16: *C. albicans* induziert in PMN eine stärkere Motilität als *C. glabrata*.

Das mittlere Abstandsquadrat (*mean square displacement* (MSD)) wurde für PMN bestimmt, bevor diese *C. albicans* (rot) oder *C. glabrata* (grün) phagozytierten. Das MSD weist eine zeitlich lineare Abhängigkeit auf und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der MSD Kurven und sind nur zu bestimmten Zeitpunkten beispielhaft gezeigt. Die gestrichelten grauen Linien dienen der optischen Verdeutlichung der Signifikanz der Ergebnisse. Die theoretischen MSD-Kurven basieren auf dem Migrationsmodell des *persistent random walk*.

6 Diskussion

C. albicans zählt zu den wichtigsten Pathogenen unter den opportunistischen Pilzen und ist der häufigste Auslöser invasiver *Candida* Infektionen und der *Candida* Sepsis (Falagas et al. 2010, Edmond et al. 1999). Daher stellt *C. albicans* auch den Modell-Organismus in der aktuellen Forschung dar, um die Immunantwort auf *Candida* zu untersuchen. Allerdings geraten zunehmend die non-*albicans* Spezies in den Fokus. In den letzten Jahrzehnten konnte eine stetige Zunahme von durch non-*albicans* Spezies verursachten, invasiven Blutstrominfektionen festgestellt werden. Innerhalb der non-*albicans* Spezies ist *C. glabrata* der am häufigsten isolierte Erreger der invasiven Candidiasis (Pfaller et al. 2014). *C. glabrata* Infektionen sind mit längeren Krankenhausaufenthalten und höheren Kosten assoziiert und stellen aufgrund hoher Resistenzraten gegenüber Azolantibiotika ein schwerwiegendes Problem mit limitierten Therapiemöglichkeiten dar (Moran et al. 2010, Fidel et al. 1999). Da *C. albicans* und *C. glabrata* sowohl als Kommensale als auch als Erreger lebensbedrohlicher Infektionen vorkommen können und die Entwicklung einer Sepsis mit einer Dysfunktion der menschlichen Immunantwort einhergeht, ist gerade die Kenntnis der Immunzellinteraktion mit diesen *Candida* Spezies von zentraler Bedeutung, um neue Therapiemöglichkeiten zu etablieren. Bisherige Untersuchungen sprechen dafür, dass verschiedene *Candida* Spezies unterschiedliche Immunreaktionen auslösen (Arendrup et al. 2002, Toth et al. 2014). Dies gilt insbesondere für *C. albicans* und *C. glabrata*. Obwohl sie derselben Gattung angehören, sind sie nur entfernt miteinander verwandt. Beide Spezies besiedeln zwar ähnliche Nischen und befallen ähnliche Patienten-Kohorten, allerdings fallen besonders hinsichtlich ihrer Virulenz beträchtliche Unterschiede auf. Während *C. albicans* mit verschiedenen Virulenzfaktoren wie zum Beispiel der morphologischen Plastizität aktiv zur Wirtsschädigung und Invasivität beiträgt, ist die Interaktion zwischen dem Wirtsorganismus und *C. glabrata* noch weniger bekannt. Einiges weist darauf hin, dass *C. glabrata* eher eine Strategie verfolgt, die durch eine heimliche Persistenz und geringere Schädigung des Wirtsorganismus gekennzeichnet ist (Jacobsen et al. 2010, Brunke und Hube 2013). Zahlreiche Studien konnten bisher belegen, dass PMN die Hauptakteure in der Immunantwort bei invasiven *Candida* Infektionen sind. Sie dominieren die transkriptionelle Antwort von *C. albicans* während der Inkubation mit menschlichen Blut (Fradin et al. 2005)

und induzieren diverse Stress-Reaktionen in *Candida* Spezies (Enjalbert et al. 2007, Fukuda et al. 2013, Jandric und Schuller 2011, Rubin-Bejerano et al. 2003).

Diese Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der Interaktion und Aktivierung von humanen PMN durch *C. albicans* und *C. glabrata* beitragen. Dafür sind primäre Immunzellkonfrontationsuntersuchungen besonders geeignet, da sie eine wichtige Grundlage in der Erforschung komplexer Zusammenhänge von Immunzellinteraktionen darstellen. Experimente mit isolierten Immunzellen haben den Vorteil, dass die Ergebnisse eindeutig zugeordnet werden können, während komplexere Modelle oft keine Rückschlüsse darüber zulassen, auf welche Immunzellen spezielle Funktionen zurückzuführen sind.

6.1 Lebendzellmikroskopie zur Visualisierung der Immunzellinteraktion

Mithilfe der Etablierung der Lebendzellmikroskopie, welche die Visualisierung dynamischer Zell-Mikroben-Interaktionen in Echtzeit ermöglicht, konnten einzelne Aspekte der Immunzellinteraktion wie z.B. Phagozytose-Raten, die bisher nur zu bestimmten Zeitpunkten gemessen wurden, kontinuierlich betrachtet werden. Im Gegensatz zu vorherigen Studien (Behnsen et al. 2007, Lewis et al. 2012, Rudkin et al. 2013, Toth et al. 2014) wurde in dieser Arbeit bewusst eine höhere Bilderfrequenz von $\Delta t = 10s$ verwendet, um die Dynamik der Immunzellinteraktion möglichst lückenlos darstellen zu können. Derzeit werden lebendzellmikroskopische Aufnahmen meistens für die illustrative Darstellung von Beobachtungen genutzt und die Analyse konfokalmikroskopischer Aufnahmen erfolgt häufig noch durch die manuelle Bestimmung von Zellzahlen und Zellinteraktionen, die sehr zeitaufwändig und fehlerbehaftet sind. Diese Arbeit sollte ebenfalls dazu dienen, lebendzellmikroskopische Daten zu generieren, die die Entwicklung einer vollautomatisierten Bilderanalyse ermöglichen. Eine vollautomatische Analyse der Immunzellinteraktion zwischen Makrophagen und *Aspergillus fumigatus* konnte bereits standardisiert werden. Darauf basierend können in Zukunft weitere systembiologische Studien und mathematische Modellierungen für die Makrophagen-Pathogen Interaktion etabliert werden (Mech et al. 2011). Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der PMN voll automatisch segmentiert und

getrackt werden können (Brandes et al. 2015). Zur Evaluierung der automatisierten Bilderanalyse und der quantitativen Analyse der Interaktion mit *Candida* mussten die lebendzellmikroskopischen Konfrontationsuntersuchungen dieser Arbeit noch zeitintensiv manuell getrackt werden.

6.2 *Candida* spp. werden von PMN unterschiedlich effektiv phagozytiert

Die Analyse der Interaktion zwischen PMN mit *C. albicans* und *C. glabrata* brachte beträchtliche Unterschiede der Phagozytose-Häufigkeiten, ihrem zeitlichen Verlauf, der Migrationseigenschaften der PMN und den Kontakten zwischen Pilz und Immunzelle hervor. Die individuelle Betrachtung einzelner Aspekte des Phagozytose-Prozesses wie der Migration, Pathogen-Erkennung, der Phagozytose selbst, Phagosomenreifung und das Absterben der Wirtszelle oder des aufgenommenen Pathogens konnten bereits in anderen Arbeiten neue Erkenntnisse hervorbringen (Lewis et al. 2012). Verschiedene Studien belegten *Candida* Spezies-spezifische Unterschiede in der Assoziationsrate mit Phagozyten. Makrophagen phagozytieren *C. glabrata* und *C. lusitaniae* häufiger als *C. albicans* Hefen (Dementhon et al. 2012, Keppler-Ross et al. 2010) und auch *C. parapsilosis* wird sowohl von PMN als auch von Makrophagen effektiver phagozytiert als *C. albicans* (Linden et al. 2010, Toth et al. 2014). Diese Arbeit analysierte unseres Wissens zum ersten Mal lebendzellmikroskopisch die Interaktion von PMN mit *C. glabrata*. Unter Hyphen-induzierenden Bedingungen bildete lediglich *C. albicans* Filamente aus, während *C. glabrata* weiterhin als Hefe wuchs. Die quantitative Analyse zeigte eine rasch einsetzende und effektive Phagozytose der *C. albicans* Hyphen durch PMN. Zusätzliche Versuche mit *C. albicans* Hefen zeigten eine leicht verspätete, aber im Ausmaß vergleichbare Immunantwort. Mit der zügig beginnenden Filamentierung kam es auch zur effektiven Aufnahme von *C. albicans*. Dieser Zusammenhang zwischen der morphologischen Plastizität und der Pathogenität von *C. albicans* konnte bereits beschrieben werden. PMN sind in der Lage, zwischen der Hefeform und der filamentösen Form von *C. albicans* zu unterscheiden und gerade der Wechsel zur filamentösen Form wird als wichtiger Virulenzfaktor angesehen. Während *C. albicans* Hefen von PMN weitestgehend ignoriert werden, kommt es zur selektiven Phagozytose von *C. albicans* Filamenten (Wozniok et al. 2008). Im

Gegensatz dazu zeigte der Vergleich mit dem monomorphen Pilz *C. glabrata*, dass sich die geringe Aktivierung der PMN auch in einer mäßigen Phagozytose durch PMN widerspiegelte. *C. glabrata* wurde signifikant weniger phagozytiert als *C. albicans* und die stattfindenden Phagozytose-Ereignisse traten zufällig über die gesamte Dauer der Konfrontation auf. Auch während der Koinkubation von *C. albicans* und *C. glabrata* mit PMN kam es zu keiner verstärkten Aufnahme von *C. glabrata*. Dadurch konnte belegt werden, dass nicht allein die Aktivierung der PMN, hier durch *C. albicans*, genügt, um *C. glabrata* zu phagozytieren. Vielmehr scheinen *C. glabrata* und *C. albicans* von PMN unterschiedlich erkannt zu werden.

Zur genaueren Analyse wurden daher die Kontakte zwischen den *Candida* Spezies und PMN analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es bei beiden *Candida* Spezies zu zahlreichen Kontakten zwischen Immunzellen und den Pilzzellen kam. Allerdings resultierte nicht jeder Kontakt in einer erfolgreichen Phagozytose. Während ein Kontakt zwischen PMN und *C. albicans* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zur Phagozytose führte, wurde *C. glabrata* nur in einer Minderheit aller Kontakte von den PMN aufgenommen. Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich den Nutzen lebendzellmikroskopischer Aufnahmen. Erstmals konnte hiermit die niedrige PMN-Phagozytose-Effizienz von *C. glabrata* nachgewiesen werden. Eine Studie um Behnsen *et al.* beschäftigte sich mit der Phagozytose-Effizienz von PMN, Makrophagen und Dendritischen Zellen in Konfrontation mit *C. albicans* und *A. fumigatus* und veranschaulichte, dass die Phagozytose eines Pathogens nicht immer die Konsequenz eines physikalischen Kontaktes sein muss. Die räumliche Umgebung war dabei ein ausschlaggebender Faktor, der die Phagozytose-Effizienz beeinflusste (Behnsen *et al.* 2007). Zudem wurde bereits in zahlreichen Studien der Einfluss unterschiedlicher Zellwandbestandteile auf die Immunzellerkennung untersucht (McKenzie *et al.* 2010, Sheth *et al.* 2011, Netea *et al.* 2008, Poulain und Jouault 2004, Hiller *et al.* 2011, Jouault *et al.* 2003, Mora-Montes *et al.* 2010). Auch die unterschiedliche Immunantwort auf *C. albicans* Hefen und Hyphen kann auf die unterschiedliche Expression von Zellwandbestandteilen zurückgeführt werden (Chaffin 2008, Ebanks *et al.* 2006, Heilmann *et al.* 2011). Beispielsweise induziert der S-Typ Lektin-Rezeptor Gal-3 die Phagozytose von *C. parapsilosis* Hefen und *C. albicans* Hyphen aber nicht von *C. albicans* Hefen (Linden *et al.* 2013). Des Weiteren stellten Sheth *et al.* fest, dass die Zellwandglykosylierung von *C. albicans* die Erkennung und Phagozytose durch PMN beeinflusst. Der Verlust von N-/O-

verlinkten Glykanen an der Oberfläche von *C. albicans* führte zwar zur Akkumulation von *C. albicans* an der PMN Oberfläche, jedoch zur verringerten Phagozytose (Sheth et al. 2011). Möglicherweise stellen die PMN-Erkennung und -Aufnahme von Pilzzellen zwei individuelle Schritte dar, die durch voneinander unabhängigen Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermittelt werden. Dies könnte ebenfalls erklären, weshalb *C. glabrata* häufig kontaktiert, jedoch nicht phagozytiert wird. Über die PRR-PAMP-Interaktion, welche die Erkennung und Phagozytose von *C. glabrata* vermitteln, ist bisher relativ wenig bekannt. Dabei unterscheidet sich der Zellwandaufbau von *C. glabrata* und *C. albicans* erheblich. *C. glabrata* besitzt 50% mehr Mannose und nur 33% Chitin (de Groot et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass an der Immunzellerkennung von *C. glabrata* andere PRR beteiligt sind als für *C. albicans*. Kürzlich konnte dem C-Typ Lektin-Rezeptor Dectin-2 eine Rolle an der Erkennung von *C. glabrata* zugeschrieben werden. Dectin-2-defiziente PMN phagozytierten signifikant seltener *C. glabrata*, was mit einem verminderten Abtöten der Pilzzellen einherging (Ifrim et al. 2014). Hier bedarf es in Zukunft jedoch noch weitere intensive Untersuchungen, um Zellwandbestandteile von *C. glabrata* und Immunzellrezeptoren zu identifizieren, die an der Immunzell-Erkennung und -Interaktion beteiligt sind.

6.3 *Candida* spp. induzieren unterschiedliche migratorische Aktivität in PMN

Neben der Analyse der Phagozytose-Effizienz interessierte uns vor allem, ob mittels lebendzellmikroskopischer Aufnahmen Unterschiede in der migratorischen Aktivität der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden können. Eine hohe migratorische Aktivität und gezielte Migration der PMN zum Infektionsherd ist Grundvoraussetzung für eine gezielte Erkennung und Beseitigung fremder Mikroorganismen. Während Makrophagen mittlere Geschwindigkeiten von 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$ erreichen (Lewis et al. 2012), sind PMN die sich am schnellsten fortbewegenden Immunzellen und erreichen dabei Geschwindigkeiten von bis zu 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. In unseren Konfrontationsuntersuchungen mit *C. albicans* bzw. *C. glabrata* bewegten sich PMN durchschnittlich mit 15.9 $\mu\text{m}/\text{min}$ bzw. 12.1 $\mu\text{m}/\text{min}$ fort (Daten nicht gezeigt). PMN bewegen sich nicht nur schneller fort als Makrophagen, auch die Zeitspanne

zwischen Zell-Zell-Kontakt und erfolgreicher Phagozytose ist für PMN kürzer (Rudkin et al. 2013). Dadurch kommt es schon frühzeitig zu diversen Zellinteraktionen und der Möglichkeit Pathogene aufzunehmen. Dies kann dahingehend von biologischer Relevanz sein, da *C. albicans* weniger Zeit hat, Hyphen auszubilden und die Länge der Hyphen zum Phagozytosezeitpunkt mit dem Absterben von Wirtszellen assoziiert (McKenzie et al. 2010, Lewis et al. 2012, Lorenz et al. 2004).

Mithilfe einer vollautomatisierten Charakterisierung und Parameter-freien Klassifizierung konnte das lokale Migrationsverhalten der PMN quantitativ analysiert werden. Dabei wurden die Zelltracks einzelner Zellen individuell betrachtet, was spezifische Aussagen über Bewegungsabläufe individueller Zellen zulässt. (Mokhtari et al. 2013). Unsere Analyse belegte, dass *C. albicans* Filamente die Motilität von PMN stärker beeinflussten als *C. glabrata*. Dies deutet weiterhin auf die wichtige Rolle der Filamentierung von *C. albicans* hin. *C. albicans* Filamente induzieren im Gegensatz zu *C. albicans* Hefen eine gezielte Motilität der PMN (Wozniok et al. 2008). Hierfür werden unter anderem Zellwandbestandteile, Peptide und chemotaktisch wirkende Substanzen verantwortlich gemacht, die von *C. albicans* selbst sekretiert werden (Cutler 1977, Edens et al. 1999, Sato et al. 2006). Unter anderem bewirkt die von *C. albicans* Filamenten an der Pilzoberfläche exprimierte SAP9 eine gerichtete Motilität bei PMN (Hornbach et al. 2009). Im Gegensatz dazu scheint die migratorische Aktivität von Makrophagen während der Konfrontation mit *C. albicans* vom Glykosylierungsstatus aber nicht von dem morphologischen Wechsel zwischen Hefe und Hyphe abhängig zu sein (Lewis et al. 2012).

6.4 PMN Aktivierung durch *C. albicans* und *C. glabrata*

Zusätzlich zu der lebendzellmikroskopischen Analyse der Pathogen-Wirt-Interaktion sollte die PMN-Aktivierung durch *C. albicans* und *C. glabrata* analysiert werden, um Unterschiede in den PMN Effektormechanismen festzustellen. Die Experimente dieser Arbeit wurden allesamt mit hitzeinaktiviertem humanem Serum durchgeführt, damit das Komplement-System inaktiviert und lediglich die *Candida* Spezies selbst als Interakteur in Betracht gezogen werden konnte. Die durchgeführten Konfrontationsuntersuchungen zeigten, dass *C. albicans* und *C. glabrata* eine

deutlich unterschiedliche PMN-Aktivierung auslösen. Unsere Daten sprechen für eine durch *C. albicans* induzierte schnelle und starke PMN-Aktivierung. Diese äußerte sich in einer stark veränderten Oberflächenpräsentation der Aktivierungsmarker CD66b, CD63 und CD16, einer signifikanten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und einer effizienten Sekretion antimikrobieller Peptide. Dies steht in deutlichem Kontrast zur PMN-Antwort auf *C. glabrata*, die durch einen langsameren Beginn und ein reduziertes Ausmaß gekennzeichnet war. Aktivierungsmarker, Produktion von ROS und die Sekretion von Lactoferrin, Elastase 2 und Myeloperoxidase waren allesamt niedriger für *C. glabrata* als für *C. albicans*. Während in dem von Hünninger *et al.* etablierten Vollblutmodell C5a die Aktivierung aller PMN induzierte, konnten wir für die primären PMN Konfrontationen nur eine Aktivierung von PMN feststellen, die mit Pilzen assoziiert waren (Hünninger *et al.* 2015). PMN, ohne Kontakt zu *Candida* wurden im Gegensatz zum Vollblutmodell auch nicht aktiviert. Hieraus lässt sich folgern, dass es erst Kontakt-abhängig oder nach Phagozytose zur vollständigen Aktivierung der PMN kommt.

Die Wichtigkeit des fungizid wirkenden oxidativen Bursts kann durch das Krankheitsbild CGD (*chronic granulomatous disease*) belegt werden. Hierbei können neutrophile Granulozyten durch einen genetischen Defekt des NADPH-Oxidase-Komplexes keine ROS bilden. Patienten mit CGD haben ein deutlich erhöhtes Risiko für Disseminierung im Rahmen von Candidämien. Sie zeigen außerdem erhöhte Suszeptibilität für Pilzinfektionen (Cohen *et al.* 1981). Unsere Daten zeigen, dass die Konfrontation mit verschiedenen *Candida* spp. zu einer unterschiedlich starken Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Während der Konfrontation mit *C. albicans* produzierten PMN signifikant mehr ROS als bei *C. glabrata*. Um den sowohl extra-, als auch intrazellulär präsenten oxidativen Stress zu überleben, haben Mikroorganismen einige protektive Mechanismen entwickelt, die die ROS Bildung aktiv inhibieren können (Wellington *et al.* 2009, Seider *et al.* 2011). *C. albicans* und *C. glabrata* exprimieren eine Reihe von oxidativen Stress Genen, die unter anderem für die Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT) oder die Glutathion Peroxidase kodieren (Fradin *et al.* 2005, Rubin-Bejerano *et al.* 2003, Cuellar-Cruz *et al.* 2008). Des Weiteren resultiert die Konfrontation mit *C. glabrata* und PMN in der Induzierung weiterer Stress-Reaktionen wie der Hochregulierung der Glykogenese, des Glyoxylatzyklus und des langkettigen Fettsäuremetabolismus (Fukuda *et al.* 2013). Der Erfolg eines Pathogens, innerhalb des menschlichen Körpers zu überleben, wird

neben der Induzierung einer Stressantwort auch durch die Induzierung des Zelltodes der Wirtszelle, der Vermeidung von Kontakt mit den Immunzellen, der Verhinderung der Phagozytose, dem Überleben innerhalb Immunzellen und ebenfalls durch die Stressresistenz gegenüber ROS, RNS (*reactive nitrogen species*) und weiteren PMN Effektormechanismen maßgeblich mit beeinflusst (Brown et al. 2009, Urban et al. 2006a). Pathogene mit einer starken oxidativen Toleranz wie z. B. *C. albicans* sind deshalb möglicherweise resistenter und schwieriger abzutöten (Urban et al. 2006a).

PMN induzieren in *C. albicans* eine Reihe von Stressreaktionen, die möglicherweise synergistisch zur Abtötung von *C. albicans* beitragen (Kaloriti et al. 2014, Kaloriti et al. 2012, Miramon et al. 2012, Miramon et al. 2014). Experimente unserer Arbeitsgruppe belegten, dass durch die Konfrontation mit PMN, *C. glabrata* ihre metabolische Aktivität signifikant stärker reduzierten als *C. albicans* (Duggan et al. 2015). Weiterhin konnte durch lebendzellmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, dass phagozytierte *C. glabrata* von PMN effektiver abgetötet wurden als *C. albicans*. Extrazelluläre Pilze verblieben größtenteils lebendig. Interessanterweise genügte somit die geringere PMN-Aktivierung, um *C. glabrata* effektiv abzutöten. Während *C. glabrata* in der Lage ist, mehrere Tage in Makrophagen zu überleben, sich zu replizieren und schließlich den Wirt wieder zu verlassen bzw. abzutöten, scheinen PMN über ein Arsenal zu verfügen, das *C. glabrata* effektiv abtöten kann (Seider et al. 2011, Seider et al. 2014, Duggan et al. 2015). Des Weiteren sind PMN die einzigen Immunzellen, welche die intrazelluläre Filamentierung von *C. albicans* verhindern können (Wozniok et al. 2008, Hünninger et al. 2014). Gleichzeitig scheint *C. albicans* jedoch trotz starker PMN-Aktivierung mit umfassenden fungiziden Mechanismen widerstandsfähiger gegenüber der PMN-Attacke, was sich in einer höheren Überlebensrate widerspiegelte.

Die von den Zellen des angeborenen Immunsystems sekretierten Zytokine und Chemokine dienen vor allem zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, Induzierung einer inflammatorischen Reaktion und tragen damit auch indirekt zur Beseitigung und Abtötung der Pathogene bei. Nach Erkennung von *Candida* kommt es Rezeptor-abhängig zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine stimulieren. Bisherige Untersuchungen in einem Vollblutmodell, als auch bei primären Immunzellkonfrontationen mit NK-Zellen oder Makrophagen konnten belegen, dass *C. albicans* die Sekretion einer Reihe von Zytokinen wie TNF α , INF- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 und somit eine starke pro-

inflammatorische Immunantwort induziert (Voigt et al. 2014, Hünninger et al. 2014, Seider et al. 2011). Im Gegensatz dazu produzieren *C. glabrata*-infizierte Makrophagen deutlich weniger Zytokine und auch in einem Maus- sowie einem Hühnerembryonen-Modell konnte für *C. glabrata* nur eine moderate und deutlich geringere Produktion pro-inflammatorischer Zytokine als für *C. albicans* Infektionen nachgewiesen werden (Seider et al. 2011, Jacobsen et al. 2010, Jacobsen et al. 2011). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die schnelle und starke Aktivierung der PMN durch *C. albicans* zu einer massiven Produktion der beiden pro-inflammatorischen Chemoattraktoren IL-8 und GRO α führte. Insbesondere IL-8 wirkt stark aktivierend und induziert die Rekrutierung weiterer PMN an den Infektionsherd (Wozniok et al. 2008). Diese Rekrutierung weiterer PMN konnte zudem mithilfe der Lebendzellmikroskopie visuell dargestellt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die bisher in der Literatur gültige Meinung, dass *C. albicans* eine Immunantwort induziert, die von PMN dominiert wird (Fradin et al. 2005, Hünninger et al. 2014, Shoham und Levitz 2005, Cheng et al. 2012). Im Gegensatz dazu induzierte *C. glabrata* eine stärkere Sekretion der Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β , welche die Migration von Monozyten stimulieren, aber PMN nicht beeinflussen (Maurer und von Stebut 2004, Menten et al. 2002). Des Weiteren wurde der *macrophage migration inhibition factor* MIF im Vergleich zur Infektion der PMN mit *C. albicans* in Gegenwart von *C. glabrata* kaum ausgeschüttet. Dieses Zytokinprofil deutete darauf hin, dass vermehrt Monozyten in der Abwehr von *C. glabrata* Infektionen involviert sind. In weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von Transwell-Migrations-Experimenten und lebendzellmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine PMN-Aktivierung durch *C. glabrata* zu einer erhöhten Migration von Monozyten an den Ort der PMN-*C. glabrata* Konfrontation sowie einer gesteigerten Phagozytose-Effizienz von *C. glabrata* durch die Monozyten führte (Duggan et al. 2015). Gegensätzlich resultierte die Aktivierung von PMN als Antwort auf *C. albicans* in der weiteren Rekrutierung von PMN. Diese Ergebnisse weisen somit auf eine Involvierung unterschiedlicher Immunzellen in der Pathogenabwehr verschiedener *Candida* Spezies hin. Die Rekrutierung von Monozyten kann einerseits dazu dienen, PMN bei der Beseitigung der *C. glabrata* Infektion zu unterstützen. Andererseits könnte es auch ein von *C. glabrata* aktiv induzierter Überlebensmechanismus sein, da *C. glabrata* zwar von PMN effektiv abgetötet werden, aber in Makrophagen überleben und sich sogar im Phagosom replizieren können (Seider et al. 2011,

Seider et al. 2014). Monozyten könnten somit während der *C. glabrata* Infektion als eine Art „Trojanisches Pferd“ dienen, indem sie *C. glabrata* durch die Phagozytose vor den extrazellulären Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems schützen.

7 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lieferten neue Erkenntnisse über die Aktivierung und Interaktion zwischen primären PMN und *C. albicans* bzw. *C. glabrata* und konnten zeigen, dass die beiden *Candida* spp. unterschiedlich durch PMN wahrgenommen werden. Interessanterweise wurde *C. albicans* trotz effizienterer Phagozytose und stärkerer Aktivierung weniger effektiv abgetötet als *C. glabrata*.

Die Etablierung der Lebendzellmikroskopie ermöglichte die Entwicklung einer vollautomatisierten PMN-Trackingmethode und die Echtzeitanalyse der Immunzellinteraktion mit quantitativer Analyse der Phagozytose und der Motilität. Hierbei konnte festgestellt werden, dass *C. albicans* von PMN signifikant häufiger phagozytiert wird als *C. glabrata*. Dies konnte auf eine deutlich niedrigere Phagozytoseeffizienz der PMN nach Kontakt mit *C. glabrata* zurückgeführt werden. Hierfür scheinen am ehesten unterschiedliche PRR-PAMP-Interaktionen verantwortlich zu sein, was in zukünftigen Arbeiten zu evaluieren wäre. Weiterhin wurde die migratorische Aktivität von PMN durch *C. albicans* stärker beeinflusst als durch *C. glabrata*. Dies ist unter anderem auf eine stärkere Sekretion von PMN Chemoattraktoren wie IL-8 und GRO α zurückzuführen. Die Konfrontation von PMN mit *C. glabrata* führte dahingegen zur Sekretion eines Zytokinprofils, das zur Aktivierung und Rekrutierung von Monozyten an den Infektionsherd führt.

Zusammenfassend hat diese Arbeit durch die Etablierung der Lebendzellmikroskopie zu einem besseren Verständnis der Immunzellinteraktion zwischen PMN und *C. albicans* sowie *C. glabrata* beigetragen. Zukünftig steht neben der Entwicklung einer vollautomatisierten Bilderanalyse der Pathogen-Wirt-Interaktion, auch die Identifizierung von Zellwandbestandteilen und Immunzellrezeptoren im Fokus, die an der Erkennung und Phagozytose von *C. glabrata* beteiligt sind.

8 Literaturverzeichnis

- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE, Filler SG, Hube B. 2008. the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog*, 4 (11):e1000217.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Moller N. 2002. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection*, 30 (5):286-291.
- Babior BM. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*, 109 (1):33-44.
- Bain J, Gow NA, Erwig LP. 2015. Novel insights into host-fungal pathogen interactions derived from live-cell imaging. *Semin Immunopathol*, 37 (2):131-139.
- Behnsen J, Narang P, Hasenberg M, Gunzer F, Bilitewski U, Klippel N, Rohde M, Brock M, Brakhage AA, Gunzer M. 2007. Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 3 (2):e13.
- Blanco JL, Garcia ME. 2008. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol*, 125 (1-2):47-70.
- Borregaard N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33 (5):657-670.
- Brandes S, Mokhtari Z, Essig F, Hünninger K, Kurzai O, Figge MT. 2015. Automated segmentation and tracking of non-rigid objects in time-lapse microscopy videos of polymorphonuclear neutrophils. *Med Image Anal*, 20 (1):34-51.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303 (5663):1532-1535.
- Brown AJ, Haynes K, Quinn J. 2009. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Curr Opin Microbiol*, 12 (4):384-391.
- Brunke S, Hube B. 2013. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol*, 15 (5):701-708.
- Calderone RA, Fonzi WA. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9 (7):327-335.
- Chaffin WL. 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72 (3):495-544.
- Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. 2012. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*, 80 (4):1304-1313.
- Cohen MS, Isturiz RE, Malech HL, Root RK, Wilfert CM, Gutman L, Buckley RH. 1981. Fungal infection in chronic granulomatous disease. The importance of the phagocyte in defense against fungi. *Am J Med*, 71 (1):59-66.
- Csank C, Haynes K. 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett*, 189 (1):115-120.
- Cuellar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Canas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castano I, De Las Penas A. 2008. High resistance to

- oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell*, 7 (5):814-825.
- Cutler JE. 1977. Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 18 (3):568-573.
- Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruere C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*, 12 (2):248-271.
- de Groot PW, Kraneveld EA, Yin QY, Dekker HL, Gross U, Crielaard W, de Koster CG, Bader O, Klis FM, Weig M. 2008. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell*, 7 (11):1951-1964.
- Dementhon K, El-Kirat-Chatel S, Noel T. 2012. Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. *PLoS One*, 7 (3):e32621.
- Duggan S, Essig F, Hünninger K, Mokhtari Z, Bauer L, Lehnert T, Brandes S, Hader A, Jacobsen ID, Martin R, Figge MT, Kurzai O. 2015. Neutrophil activation by *Candida glabrata* but not *Candida albicans* promotes fungal uptake by monocytes. *Cell Microbiol*.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neugeglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekai F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430 (6995):35-44.
- Ebanks RO, Chisholm K, McKinnon S, Whiteway M, Pinto DM. 2006. Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. *Proteomics*, 6 (7):2147-2156.
- Edens HA, Parkos CA, Liang TW, Jesaitis AJ, Cutler JE, Miettinen HM. 1999. Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages. *Infect Immun*, 67 (3):1063-1071.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, 29 (2):239-244.
- Enjalbert B, MacCallum DM, Odds FC, Brown AJ. 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*, 75 (5):2143-2151.
- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. 2010. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients

- in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 14 (11):e954-966.
- Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 12 (1):80-96.
- Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol*, 56 (2):397-415.
- Fridkin SK, Jarvis WR. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 9 (4):499-511.
- Fukuda Y, Tsai HF, Myers TG, Bennett JE. 2013. Transcriptional profiling of *Candida glabrata* during phagocytosis by neutrophils and in the infected mouse spleen. *Infect Immun*, 81 (4):1325-1333.
- Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 12 (11):1035-1044.
- Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW. 2009. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun*, 77 (4):1596-1605.
- Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, 198 (2):179-182.
- Hager M, Cowland JB, Borregaard N. 2010. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, 268 (1):25-34.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186:1-85.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92 (9):3007-3017.
- Heilmann CJ, Sogho AG, Siliakus AR, Dekker HL, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ, Klis FM. 2011. Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. *Microbiology*, 157 (Pt 8):2297-2307.
- Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMenamin ME, Batista EL, Jr., Van Dyke TE, Simons ER. 2007. Sequential chemotactic and phagocytic activation of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*, 75 (8):3989-3998.
- Hickey MJ, Kubes P. 2009. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol*, 9 (5):364-375.
- Hiller E, Zavrel M, Hauser N, Sohn K, Burger-Kentischer A, Lemuth K, Rupp S. 2011. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host--focus on the function of cell wall proteins. *Int J Med Microbiol*, 301 (5):384-389.

- Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. 1993. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (9):1962-1965.
- Hornbach A, Heyken A, Schild L, Hube B, Löffler J, Kurzai O. 2009. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protease Sap9 modulates the interaction of *Candida albicans* with human neutrophils. *Infect Immun*, 77 (12):5216-5224.
- Hünniger K, Lehnert T, Bieber K, Martin R, Figge MT, Kurzai O. 2014. A virtual infection model quantifies innate effector mechanisms and *Candida albicans* immune escape in human blood. *PLoS Comput Biol*, 10 (2):e1003479.
- Hünniger K, Bieber K, Martin R, Lehnert T, Figge MT, Löffler J, Guo RF, Riedemann NC, Kurzai O. 2015. A second stimulus required for enhanced antifungal activity of human neutrophils in blood is provided by anaphylatoxin C5a. *J Immunol*, 194 (3):1199-1210.
- Ifrim DC, Bain JM, Reid DM, Oosting M, Verschueren I, Gow NA, van Krieken JH, Brown GD, Kullberg BJ, Joosten LA, van der Meer JW, Koentgen F, Erwig LP, Quintin J, Netea MG. 2014. Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. *Infect Immun*, 82 (3):1064-1073.
- Jacobsen ID, Grosse K, Berndt A, Hube B. 2011. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS One*, 6 (5):e19741.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10 (1):85-93.
- Jacobsen ID, Brunke S, Seider K, Schwarzmüller T, Firon A, d'Enfert C, Kuchler K, Hube B. 2010. *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infect Immun*, 78 (3):1066-1077.
- Jandric Z, Schuller C. 2011. Stress response in *Candida glabrata*: pieces of a fragmented picture. *Future Microbiol*, 6 (12):1475-1484.
- Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel PA, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis*, 188 (1):165-172.
- Kaloriti D, Jacobsen M, Yin Z, Patterson M, Tillmann A, Smith DA, Cook E, You T, Grimm MJ, Bohovych I, Grebogi C, Segal BH, Gow NA, Haynes K, Quinn J, Brown AJ. 2014. Mechanisms underlying the exquisite sensitivity of *Candida albicans* to combinatorial cationic and oxidative stress that enhances the potent fungicidal activity of phagocytes. *MBio*, 5 (4):e01334-01314.
- Kaloriti D, Tillmann A, Cook E, Jacobsen M, You T, Lenardon M, Ames L, Barahona M, Chandrasekaran K, Coghill G, Goodman D, Gow NA, Grebogi C, Ho HL, Ingram P, McDonagh A, de Moura AP, Pang W, Puttnam M, Radmaneshfar E, Romano MC, Silk D, Stark J, Stumpf M, Thiel M, Thorne T, Usher J, Yin Z, Haynes K, Brown AJ. 2012. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. *Med Mycol*, 50 (7):699-709.

- Kaur R, Ma B, Cormack BP. 2007. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (18):7628-7633.
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, 8 (4):378-384.
- Keppler-Ross S, Douglas L, Konopka JB, Dean N. 2010. Recognition of yeast by murine macrophages requires mannan but not glucan. *Eukaryot Cell*, 9 (11):1776-1787.
- Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB. 2008. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, 4 (2):e35.
- Kozel TR. 1996. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev*, 9 (1):34-46.
- Kurzai O, Schmitt C, Brocker E, Frosch M, Kolb-Maurer A. 2005. Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells. *Int J Med Microbiol*, 295 (2):121-127.
- Lewis LE, Bain JM, Lowes C, Gillespie C, Rudkin FM, Gow NA, Erwig LP. 2012. Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS Pathog*, 8 (3):e1002578.
- Linden JR, Maccani MA, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. 2010. High efficiency opsonin-independent phagocytosis of *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Med Mycol*, 48 (2):355-364.
- Linden JR, Kunkel D, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. 2013. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cell Microbiol*, 15 (7):1127-1142.
- Liu Y, Filler SG. 2011. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*, 10 (2):168-173.
- Lorenz MC, Bender JA, Fink GR. 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, 3 (5):1076-1087.
- Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. 2013. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol*, 56 (3):161-169.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11 (8):519-531.
- Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, Walker LA, Shepardson KM, Hopke A, Mora-Montes HM, Kerrigan A, Netea MG, Murray GI, Maccallum DM, Wheeler R, Munro CA, Gow NA, Cramer RA, Brown AJ, Brown GD. 2013. Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1. *PLoS Pathog*, 9 (4):e1003315.
- Maurer M, von Stebut E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (10):1882-1886.

- McKenzie CG, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, Gow NA, Erwig LP. 2010. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun*, 78 (4):1650-1658.
- Mech F, Thywissen A, Guthke R, Brakhage AA, Figge MT. 2011. Automated image analysis of the host-pathogen interaction between phagocytes and *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 6 (5):e19591.
- Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. 2012. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol*, 504:183-200.
- Menten P, Wuyts A, Van Damme J. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13 (6):455-481.
- Michalet X. 2010. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 82 (4 Pt 1):041914.
- Miramon P, Kasper L, Hube B. 2013. Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol*, 202 (3):183-195.
- Miramon P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJ, Kurzai O, Hube B. 2012. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One*, 7 (12):e52850.
- Miramon P, Dunker C, Kasper L, Jacobsen ID, Barz D, Kurzai O, Hube B. 2014. A family of glutathione peroxidases contributes to oxidative stress resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*, 52 (3):223-239.
- Mokhtari Z, Mech F, Zitzmann C, Hasenberg M, Gunzer M, Figge MT. 2013. Automated characterization and parameter-free classification of cell tracks based on local migration behavior. *PLoS One*, 8 (12):e80808.
- Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Castillo L, Brand A, Buurman ET, Diaz-Jimenez DF, Jan Kullberg B, Brown AJ, Odds FC, Gow NA. 2010. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J Biol Chem*, 285 (16):12087-12095.
- Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK, Jr., Reed SD. 2010. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am J Infect Control*, 38 (1):78-80.
- Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6 (10):915-926.
- Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6 (3):173-182.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*, 6 (1):67-78.
- Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. 1996. The changing face of candidemia:

- emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med*, 100 (6):617-623.
- Nordenfelt P, Tapper H. 2011. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*, 90 (2):271-284.
- Ostrosky-Zeichner L, Pappas PG. 2006. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 34 (3):857-863.
- Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74 (4):323-331.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect*, 10 Suppl 1:11-23.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 20 (1):133-163.
- Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One*, 9 (7):e101510.
- Poulain D, Jouault T. 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol*, 7 (4):342-349.
- Roetzer A, Gabaldon T, Schuller C. 2011. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 314 (1):1-9.
- Romani L. 2004. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 4 (1):1-23.
- Rubin-Bejerano I, Fraser I, Grisafi P, Fink GR. 2003. Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (19):11007-11012.
- Rudkin FM, Bain JM, Walls C, Lewis LE, Gow NA, Erwig LP. 2013. Altered dynamics of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages and PMNs when both phagocyte subsets are present. *MBio*, 4 (6):e00810-00813.
- Ruhnke M, Maschmeyer G. 2002. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *Eur J Med Res*, 7 (5):227-235.
- Sasse C, Hasenberg M, Weyler M, Gunzer M, Morschhauser J. 2013. White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryot Cell*, 12 (1):50-58.
- Sato T, Iwabuchi K, Nagaoka I, Adachi Y, Ohno N, Tamura H, Seyama K, Fukuchi Y, Nakayama H, Yoshizaki F, Takamori K, Ogawa H. 2006. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta-glucan. *J Leukoc Biol*, 80 (1):204-211.
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. 2003. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*, 2 (5):1053-1060.

- Seider K, Brunke S, Schild L, Jablonowski N, Wilson D, Majer O, Barz D, Haas A, Kuchler K, Schaller M, Hube B. 2011. The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *J Immunol*, 187 (6):3072-3086.
- Seider K, Gerwien F, Kasper L, Allert S, Brunke S, Jablonowski N, Schwarzmüller T, Barz D, Rupp S, Kuchler K, Hube B. 2014. Immune evasion, stress resistance, and efficient nutrient acquisition are crucial for intracellular survival of *Candida glabrata* within macrophages. *Eukaryot Cell*, 13 (1):170-183.
- Selmeczi D, Mosler S, Hagedorn PH, Larsen NB, Flyvbjerg H. 2005. Cell motility as persistent random motion: theories from experiments. *Biophys J*, 89 (2):912-931.
- Sheth CC, Hall R, Lewis L, Brown AJ, Odds FC, Erwig LP, Gow NA. 2011. Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol*, 49 (5):513-524.
- Shoham S, Levitz SM. 2005. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*, 129 (5):569-582.
- Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. 2014. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol*, 18 (Suppl 1):S81-85.
- Sinnott JT, Cullison JP, Sweeney MP. 1987. *Candida* (Torulopsis) *glabrata*. *Infect Control*, 8 (8):334-336.
- Sobel JD. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, 369 (9577):1961-1971.
- Sudbery P, Gow N, Berman J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 12 (7):317-324.
- Toth R, Toth A, Papp C, Jankovics F, Vagvolgyi C, Alonso MF, Bain JM, Erwig LP, Gacser A. 2014. Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front Microbiol*, 5:633.
- Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. 2006a. How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol*, 8 (11):1687-1696.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006b. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8 (4):668-676.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5 (10):e1000639.
- van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*, 9 (9):2095-2102.
- Voigt J, Hunniger K, Bouzani M, Jacobsen ID, Barz D, Hube B, Löffler J, Kurzai O. 2014. Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. *J Infect Dis*, 209 (4):616-626.

- Vylkova S, Lorenz MC. 2014. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. *PLoS Pathog*, 10 (3):e1003995.
- Wellington M, Dolan K, Krysan DJ. 2009. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun*, 77 (1):405-413.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39 (3):309-317.
- Wozniok I, Hornbach A, Schmitt C, Frosch M, Einsele H, Hube B, Löffler J, Kurzai O. 2008. Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol*, 10 (3):807-820.
- Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*, 10:95-105.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis zu den angefügten lebendzellmikroskopischen Videos

1) Video S1: Konfrontation von PMN mit *C. albicans* Filamenten.

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. albicans* Filamenten (grün) bei einem MOI=1 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. PMN interagierten mit und nahmen die freien filamentösen *C. albicans* zügig und effizient auf.

2) Video S2: Konfrontation von PMN mit *C. albicans* Hefen.

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. albicans* Hefen (grün) bei einem MOI=1 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. Während die Hefezellen nicht von den PMN aufgenommen wurden, erfolgte die Phagozytose mit beginnender Filamentierung von *C. albicans* und resultierte nach 60 Minuten in einer großen Anzahl von Phagozytoseereignissen.

3) Video S3: Konfrontation von PMN mit *C. glabrata*.

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. glabrata* (grün) bei einem MOI=1 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. PMN zeigten zwar viele Kontakte mit *C. glabrata*, jedoch erfolgten innerhalb der 60 Minuten nur wenige Phagozytoseereignisse.

4) Video S4: Konfrontation von PMN mit *C. albicans* und *C. glabrata*.

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. glabrata* Hefen (grün) und BFP-exprimierenden *C. albicans* Filamenten (blau) bei einem Verhältnis von PMN zu *Candida* von 1 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. Während der Koinkubation von PMN mit beiden *Candida* spp. wurden *C. albicans* (blau) häufig von PMN aufgenommen, während die Mehrheit der *C. glabrata* Zellen nur kontaktiert wurde und extrazellulär verblieb.

5) Video S5: Konfrontation von PMN mit *C. glabrata*.

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. glabrata* (grün) bei einem MOI=5 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. Die erhöhte Anzahl an *C. glabrata* im Verhältnis zu den PMN führte zu mehr Kontakten und Phagozytoseereignissen; die Phagozytosewahrscheinlichkeit blieb allerdings dieselbe wie bei einem MOI=1.

6) Video S6: Phagozytose von *C. albicans* induziert Rekrutierung weiterer PMN

PMN (ungefärbt) wurden mit GFP-exprimierenden *C. albicans* (grün) bei einem MOI=1 für eine Stunde konfrontiert. Propidiumiodid, ein rot fluoreszierender Farbstoff, wurde dem Medium hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben. Die *C. albicans* Zellen wurden von einem PMN phagozytiert, was die Rekrutierung und Phagozytose durch sechs weitere PMN während einer 1,5-stündigen Konfrontation zur Folge hatte.

9.2 Vorträge und Publikationen

Vorträge:

„Visualization of immune cell activation by *Candida* species using live cell imaging“,
47.Jährliches Treffen der Deutschsprachigen Gesellschaft (DMykG),
Tübingen, 5.9 - 7.9.2013
Abstract veröffentlicht in Mycosis Vol. 56, September 2013

„Visualisation of the immune cell activation of *C. albicans* and *C. glabrata* with live
cell imaging“, *FungiNet Meeting*, Jena, 9.9.2014

„Neutrophils in action“, *Candida Meeting HKI*, Jena, 10.6.2015

Publikationen:

Brandes S, Mokhtari Z, Essig F, Hünninger K, Kurzai O, Figge MT (2015) Automated
segmentation and tracking of non-rigid objects in time-lapse microscopy videos of
polymorphonuclear neutrophils. *Medical Image Analysis* 20(1), 34-51.

Duggan S[†], Essig F[†], Hünninger K, Mokhtari Z, Bauer L, Lehnert T, Brandes S,
Jacobsen I, Martin R, Haeder A, Figge MT, Kurzai O (2015) Neutrophil activation by
Candida glabrata but not *Candida albicans* promotes fungal uptake by monocytes.
Cellular microbiology

[†] gleichberechtigte Erstautoren

Essig F, Hünninger K, Dietrich S, Figge MT, Kurzai O (2015) Human Neutrophils dump
C. glabrata after intracellular killing. *Fungal Genetics and Biology*. (In revision)

9.3 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oliver Kurzai, ZIK Septomics, danke ich für die Bereitstellung des spannenden Themas. Er hat mir die experimentelle und wissenschaftliche Arbeit in seinem Institut ermöglicht und mich für die *Candida*-Forschung begeistert. Mein besonderer Dank für seine ständige Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und viele gute Ideen, die für das Gelingen der Arbeit entscheidend waren.

Ein herzlicher Dank gebührt Fr. Dr. Kerstin Hünninger, ZIK Septomics. Ihre engagierte Unterstützung bei der Planung der Experimente und Etablierung neuer Methoden, wie auch bei der Analyse und Interpretation der Ergebnisse waren unverzichtbar für die praktische Durchführung der Arbeiten. Vielen Dank für das Korrektur lesen und die wertvollen Tipps und Ratschläge für die schriftliche Abfassung der Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Marc Thilo Figge und seinen MitarbeiterInnen Zeinab Mokhtari und Susanne Brandes, HKI Jena für eine hervorragende Kooperation bei der bioinformatischen Analyse der lebendzellmikroskopischen Daten. Ich bin sehr dankbar, dass ich durch diese Arbeit einen Einblick in die Grundlagen der Entwicklung automatisierter Bilderanalyseverfahren von Pathogen-Wirt Interaktionen gewinnen konnte.

Ferner gebührt der gesamten Arbeitsgruppe von Fungal Septomics mein herzlicher Dank für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, interessante Diskussionen während den wöchentlichen Gruppenseminaren und viele kollegiale Gespräche. Cindy Reichmann möchte ich für die Einarbeitung in den Umgang mit neutrophilen Granulozyten und ihre exzellente technische Assistenz danken. Vielen Dank insbesondere an Michael, Ronny, Seána, Ines, Antje, Laura und Silke.

Dem *Center for Sepsis Control and Care* (CSCC), Universitätsklinikum Jena danke ich für die Verleihung eines Promotionsstipendiums und die damit einhergehende wissenschaftliche Förderung und finanzielle Unterstützung.

Den zahlreichen freiwilligen Blutspender sei herzlichst gedankt, denn ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen Freunden und Kommilitonen David, Alexander und Ha-yeun danke ich für den ein oder anderen freundschaftlichen Rat, moralische Unterstützung und ihren ständig vermittelten Optimismus.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Andreas und Christine Essig, die mich wann immer nötig mit Rat und Tat unterstützen. Ebenfalls möchte ich meinen Geschwistern Alexander und Janina, meinen Großeltern Dieter und Gerlinde Essig und meinem Onkel Jörg Essig für ihr immer währendes Interesse, ihre aufmunternden Gespräche und den familiären Zusammenhalt danken.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Oliver Kurzai, Kerstin Hünninger, Marc- Thilo Figge, Zeinab Mokhtari und Susanne Brandes,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10.09.2015

Unterschrift des Verfassers